

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 20 AVR. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr





BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITE

26bis, rue de Saint-Pétersbourg
75800 Paris Cédex 08
Téléphone: 01 53.04.53.04 Télécopie: 01.42.94.86.54

Code de la propriété intellectuelle-livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

DATE DE REMISE DES PIÈCES: N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL: DÉPARTEMENT DE DÉPÔT: DATE DE DÉPÔT:	Alain MICHELET CABINET HARLE ET PHELIP 7 rue de Madrid 75008 PARIS France
Vos références pour ce dossier: R045FR	

1 NATURE DE LA DEMANDE	
Demande de brevet	
2 TITRE DE L'INVENTION	
	PROCEDE DE CRIBLAGE D'AGENT MODULANT L'UBIQUITINATION DE LA PROTEINE IkbAlpha ET MOYENS DESTINES A LA MISE EN OEUVRE DUDIT PROCEDE
3 DECLARATION DE PRIORITE OU REQUETE DU BENEFICE DE LA DATE DE DEPOT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE	Pays ou organisation Date N°
4-1 DEMANDEUR	
Nom	CYTOMICS SYSTEMS
Rue	Bâtiment 5
Code postal et ville	1 Avenue de la Terrasse
Pays	91198 GIF SUR YVETTE CEDEX
Nationalité	France
Forme juridique	France
	Société anonyme
5A MANDATAIRE	
Nom	MICHELET
Prénom	Alain
Qualité	CPI: bm [92-1176,, Pas de pouvoir
Cabinet ou Société	CABINET HARLE ET PHELIP
Rue	7 rue de Madrid
Code postal et ville	75008 PARIS
N° de téléphone	33 1 53 04 64 64
N° de télécopie	33 1 53 04 64 00
Courrier électronique	cabinet@harle.FR

6 DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS		Fichier électronique	Pages	Détails	
Texte du brevet		textebrevet.pdf	57	D 49, R 7, AB 1	
Dessins		dessins.pdf	11	page 11, figures 9	
Listage des sequences, PDF		seqpdf.pdf			
Listage des sequences, ASCII		seqtxt.txt			
Récépissé de dépôt. 1		biom1.pdf		CNCM I-3187	
7 MODE DE PAIEMENT					
Mode de paiement		Prélèvement du compte courant			
Numéro du compte client		607			
8 RAPPORT DE RECHERCHE					
Etablissement immédiat					
9 REDEVANCES JOINTES		Devise	Taux	Quantité	Montant à payer
062 Dépôt		EURO	0.00	1.00	0.00
063 Rapport de recherche (R.R.)		EURO	320.00	1.00	320.00
068 Revendication à partir de la 11ème		EURO	15.00	30.00	450.00
Total à acquitter		EURO			770.00

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

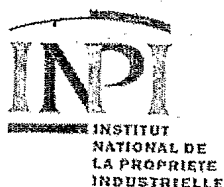
Signé par

Signataire: FR, Cabinet Harlé et Phélip, A.Michelet

Emetteur du certificat: DE, D-Trust GmbH, D-Trust for EPO 2.0

Fonction

Mandataire agréé (Mandataire 1)



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Réception électronique d'une soumission

Il est certifié par la présente qu'une demande de brevet (ou de certificat d'utilité) a été reçue par le biais du dépôt électronique sécurisé de l'INPI. Après réception, un numéro d'enregistrement et une date de réception ont été attribués automatiquement.

Demande de brevet : X

Demande de CU :

DATE DE RECEPTION	16 mars 2004	Dépôt en ligne: X Dépôt sur support CD:
TYPE DE DEPOT	INPI (PARIS) - Dépôt électronique	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUE PAR L'INPI	0450528	
Vos références pour ce dossier	R045FR	

DEMANDEUR

Nom ou dénomination sociale	CYTOMICS SYSTEMS
Nombre de demandeur(s)	1
Pays	FR

TITRE DE L'INVENTION

PROCEDE DE CRIBLAGE D'AGENT MODULANT L'UBIQUITINATION DE LA PROTEINE IkbAlpha ET MOYENS DESTINES A LA MISE EN OEUVRE DUDIT PROCEDE

DOCUMENTS ENVOYES

package-data.xml	Requetefr.PDF	fee-sheet.xml
FR-office-specific-info.xml	ValidLog.PDF	seqtxt.txt
biom1.pdf	application-body.xml	textebrevet.pdf
dessins.pdf	indication-bio-deposit.xml	request.xml
seqpdf.pdf		

EFFECTUE PAR

Effectué par:	A.Michelet
Date et heure de réception électronique:	16 mars 2004 17:45:18
Empreinte officielle du dépôt	3D:7C:4E:BB:03:E8:61:C8:F3:A2:C3:06:2E:62:F9:2B:1E:73:2D:2F

/ INPI PARIS, Section Dépôt /

SIEGE SOCIAL
INSTITUT 26 bis, rue de Saint Petersburg
NATIONAL DE 75800 PARIS cedex 08
LA PROPRIETE Téléphone : 01 53 04 53 04
INDUSTRIELLE Télécopie : 01 42 93 59 30

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention se rapporte au domaine du criblage d'agents biologiquement actifs capables de moduler l'ubiquitination de la protéine $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, en particulier d'agents d'intérêt thérapeutique, et encore plus spécifiquement d'agents thérapeutiques destinés à prévenir ou traiter des affections inflammatoires, des affections auto-immunes ou des cancers.

ETAT DE LA TECHNIQUE

L'un des grands problèmes médicaux non résolu demeure la mise au point de traitements effectifs des syndromes inflammatoires et auto-immuns. Ces pathologies sont actuellement traitées à l'aide de molécules comme des anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que l'aspirine et l'ibuprofène, et les corticostéroïdes, molécules à l'efficacité limitée et présentant des effets toxiques non négligeables. Les inhibiteurs plus spécifiques des cyclooxygénases, comme le réfécocixib et les agents bloquant le facteur de nécrose tumorale (TNF), apparus plus récemment sur le marché, se sont révélés présenter les mêmes inconvénients.

Les facteurs de transcription de la famille NF- κ B font partie des premiers moyens de défense de l'organisme lors d'infections virales, bactériennes ou fongiques et également lors de situations physiologiques de stress. Ces facteurs transcriptionnels dirigent l'expression d'un nombre important de gènes, et notamment de nombreux gènes codant pour des médiateurs de l'inflammation. Parmi ces gènes, on peut citer les gènes codant le facteur TNF- α , les interleukines IL-1, IL-6, IL-8, les molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et la E-Sélectine, la NO synthase ou encore la prostaglandine synthase Cox2.

Les facteurs de la famille NF- κ B sont activés par une grande variété de stimuli pathogènes, aussi bien endogènes qu'exogènes, ce qui inclut des protéines ou lipides bactériens, les cytokines, les facteurs de croissance et des molécules liées à des situations de stress oxydatif. L'activation des facteurs NF- κ B, en réponse à ces stimuli pathogènes, est observée pour la presque totalité des cellules impliquées dans la réponse immune, telles que les cellules épithéliales, les cellules du mésenchyme, les lymphocytes, les cellules neutrophiles et les macrophages.

Bien que l'étiologie exacte de la plupart des syndromes inflammatoires chroniques reste indéterminée à ce jour, des résultats expérimentaux, y compris des résultats d'études cliniques, ont montré le rôle important de l'activation du facteur NF- κ B, à la fois dans l'initiation de l'inflammation et dans l'installation d'un état d'inflammation chronique. Le blocage de l'activation des facteurs appartenant à la famille NF- κ B constitue donc une voie efficace pour traiter des syndromes inflammatoires tels que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, les colopathies inflammatoires, telle que la maladie de Crohn, les scléroses multiples ou le psoriasis (Ballard, 2001 ; Baud et Karin, 2001).

Il est maintenant établi que la réponse inflammatoire et l'activation du facteur NF- κ B est étroitement liée à la destruction du facteur I κ B α par la voie ubiquitine protéasome (Kroll et al, 1999; Winston et al, 1999). En effet dans des cellules non stimulées ou non-activées, le facteur NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme des cellules. Dans des cellules non stimulées ou non activées, le facteur NF- κ B est donc incapable d'activer l'expression des gènes cibles de ce facteur. L'activation des gènes cibles nécessite tout d'abord la translocation du facteur NF- κ B du cytoplasme vers le noyau. Cette translocation est déclenchée par la dégradation du facteur I κ B α par la voie ubiquitine protéasome. Le facteur I κ B α est en effet une protéine qui séquestre les facteurs NF- κ B dans le cytoplasme des cellules non stimulées (Hay et al., 1999).

Des stimuli inflammatoires exogènes, telle qu'une infection virale ou bactérienne, activent une voie de signalisation qui provoque la phosphorylation du facteur I κ B α . Cette phosphorylation a lieu spécifiquement sur les résidus Sérine en positions 32 et 36 de la séquence d'acides aminés du facteur I κ B α . Le facteur I κ B α est phosphorylé par le complexe protéique kinase I κ KK. Lorsqu'il est ainsi phosphorylé, le facteur I κ B α est reconnu par l'ubiquitine ligase SCF $^{\beta$ -TrCp (Kroll et al, 1999; Winston et al, 1999). La reconnaissance du facteur I κ B α par l'ubiquitine ligase SCF $^{\beta$ -TrCp provoque la poly-ubiquitination de ce facteur. Après ubiquitination, le facteur I κ B α est alors reconnu et dégradé par le protéasome. La destruction du facteur I κ B α provoque la libération du facteur cytoplasmique NF- κ B. Le facteur NF- κ B subit une translocation du cytoplasme vers le noyau. Une fois localisé dans le noyau des cellules stimulées, le facteur NF- κ B reconnaît spécifiquement

les promoteurs de gènes cibles et active fortement leur transcription: la réponse inflammatoire est installée (Ben Neria, 2002).

De nombreuses données expérimentales semblent confirmer que la libération du facteur NF- κ B, qui est induite par la dégradation du facteur I κ B α phosphorylé, constitue une étape essentielle pour l'initiation de l'inflammation et également pour l'installation d'une situation d'inflammation chronique (Magnani et al, 2000; Lewis et Manning, 1999).

Il existe un besoin dans l'état de la technique pour de nouveaux composés anti-inflammatoires, que ce soit pour le traitement d'un état inflammatoire aigu ou d'un état inflammatoire chronique. En particulier, il existe un besoin pour des composés anti-inflammatoires qui soient à la fois plus efficaces et plus spécifiques que les composés anti-inflammatoires connus. De tels composés anti-inflammatoires, du fait de leur spécificité vis-à-vis d'une cible biologique, seraient susceptibles de posséder des effets secondaires indésirables réduits, voire d'être exempts de tout effet secondaire indésirable.

Il existe aussi un besoin pour la mise au point de procédés pour identifier des composés d'intérêt thérapeutique, plus spécifiquement des composés anti-inflammatoires à effet amélioré, du type de ceux ci-dessus.

DESCRIPTION DE L'INVENTION

Description générale du procédé de criblage de l'invention

Selon l'invention, on a mis au point un procédé de criblage d'agents d'intérêt thérapeutique, qui sont sélectionnés pour leur spécificité d'action sur l'ubiquitination de la protéine humaine I κ B α par un complexe ubiquitine ligase comprenant la protéine humaine β -TrCP.

Le demandeur a montré que, de manière surprenante, il était possible de mimer, dans des cellules de levure, le processus de dégradation du facteur I κ B α par le protéasome, processus qui a lieu naturellement dans les cellules humaines.

De manière surprenante, on a montré selon l'invention qu'il était possible de créer artificiellement, dans des cellules de levure, un complexe

protéique possédant l'activité ubiquitine ligase et la spécificité de reconnaissance du complexe SCF^{β-TrCP} qui est produit naturellement dans les cellules humaines. Ainsi, selon l'invention, on a reconstitué, dans des cellules de levure, un complexe ubiquitine ligase artificiel comprenant des protéines de levure auxquelles est associée la protéine humaine β-TrCP. En particulier, on a montré que la protéine humaine β-TrCP, lorsqu'elle est artificiellement exprimée dans les cellules de levure, s'associe à la protéine Skp1 de levure, laquelle protéine Skp1 de levure est contenue dans un complexe protéique ubiquitine ligase de levure. Ainsi, dans une cellule de levure dans laquelle on inséré une cassette d'expression codant la protéine humaine β-TrCP, la protéine β-TrCP s'associe au complexe protéique SCF de levure qui comprend (i) un cœur catalytique constitué de l'association des protéines Skp1, Cdc53 et Hrt1, ledit cœur catalytique étant lui-même associé à l'enzyme E2 Cdc34. On a montré que ce complexe protéique hybride levure/homme est capable de mimer, dans des cellules de levure, l'activité ubiquitine ligase exercée dans des cellules humaines par le complexe SCF^{β-TrCP} humain naturel.

De manière tout aussi surprenante, on a montré selon l'invention que, dans les cellules de levure, ce complexe protéique artificiel possédant l'activité ubiquitine ligase du complexe SCF^{β-TrCP} humain n'est biologiquement actif que lorsque ce complexe artificiel est localisé dans le noyau cellulaire. Au contraire, dans les cellules humaines, le complexe SCF^{β-TrCP} naturel exerce son activité biologique dans le cytoplasme des cellules humaines, compartiment cellulaire dans lequel il réalise l'ubiquitination d'une seconde protéine également localisée dans le cytoplasme, le facteur IκBα. On a aussi montré selon l'invention que le complexe artificiel ubiquitine ligase qui a été mis au point n'est actif, dans le processus de dégradation du facteur IκBα, que lorsque le facteur IκBα est co-localisé dans le noyau avec ledit complexe artificiel ubiquitine ligase.

Ainsi, on a montré selon l'invention que, dans des cellules de levure, le complexe protéique artificiel ubiquitine ligase comprenant la protéine humaine β-TrCP est capable de réaliser l'ubiquitination du facteur IκBα humain, lorsque la protéine β-TrCP et le facteur IκBα sont artificiellement exprimés dans le noyau cellulaire.

Enfin, on a également montré que, dans des cellules de levure, l'ubiquitination du facteur I κ B α par le complexe ubiquitine ligase artificiel nouveau, bien que cette ubiquitination soit réalisée dans le noyau de la cellule, et non dans le cytoplasme cellulaire, provoque néanmoins la
5 dégradation du facteur I κ B α ubiquitiné par le protéasome.

L'ensemble des résultats surprenants ci-dessus a permis au demandeur de mettre au point un procédé de criblage d'agents capables de moduler la dégradation du facteur I κ B α dans les cellules de levure, en présence d'un complexe ubiquitine ligase artificiel mimant l'activité biologique
10 du complexe ubiquitine ligase humain SCF $^{\beta\text{-TrCp}}$ naturel.

L'invention a pour objet un procédé pour le criblage *in vitro* d'agents modulant l'ubiquitination de la protéine I κ B α par un complexe protéique fonctionnel ubiquitine ligase comprenant la protéine $\beta\text{-TrCP}$, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- 15 (a) mettre en contact un agent candidat à tester avec des cellules de levure recombinantes qui expriment dans leur noyau :
 - (i) une protéine de fusion comprenant le polypeptide I κ B α et au moins une première protéine détectable ; et
 - (ii) une protéine comprenant le polypeptide $\beta\text{-TrCP}$;
- 20 (b) quantifier ladite première protéine détectable dans les cellules de levure, à la fin d'au moins une période de temps prédéterminée après la mise en contact de l'agent candidat avec lesdites cellules ;
- (c) comparer la valeur obtenue à l'étape (b) avec une valeur témoin obtenue lorsque l'étape (a) est réalisée en l'absence de l'agent candidat.

25 Le procédé ci-dessus permet à l'homme du métier de déterminer si un agent à tester est capable de modifier la vitesse de dégradation, ou le degré de dégradation, du facteur I κ B α par le protéasome, dans les cellules de levure exprimant à la fois la protéine $\beta\text{-TrCP}$ et le facteur I κ B α humains.

Le procédé de criblage *in vitro* ci-dessus, du fait qu'il met en œuvre un
30 système d'ubiquitination artificiel humanisé dans des cellules de levure, permet un criblage d'agents qui agissent de manière spécifique sur l'activité des seules protéines humaines exprimées dans ces cellules.

De plus, grâce au procédé ci-dessus, on a mis au point un test physiologique de criblage d'agents actifs sur la voie ubiquitine ligase, en

construisant chez la levure une voie métabolique de dégradation protéique mimant la voie de dégradation par le protéasome du facteur $I\kappa B\alpha$ humain. Ainsi, du point de vue de la voie métabolique de dégradation des protéines qui est visée, le procédé de l'invention est réalisé dans des conditions
5 physiologiques très proches des conditions physiologiques de dégradation des protéines par le protéasome humain.

Grâce au procédé ci-dessus, on peut identifier les agents capables d'inhiber la vitesse ou le degré de dégradation du facteur $I\kappa B\alpha$ par le protéasome des cellules de levure. De tels agents inhibiteurs, identifiés grâce
10 au procédé de l'invention, du fait qu'ils vont inhiber également la dégradation du facteur $I\kappa B\alpha$ dans les cellules humaines, constituent des agents d'intérêt thérapeutique susceptibles d'inhiber ou de bloquer la translocation du facteur NF- κ B dans le noyau cellulaire et, en conséquence, inhiber ou bloquer l'activation, par NF- κ B, de divers gènes impliqués dans l'inflammation, des
15 pathologies d'auto-immunité ou encore des cancers.

Ainsi, le procédé de criblage *in vitro* ci-dessus peut comprendre une étape additionnelle (d) qui consiste à sélectionner positivement les agents candidats inhibiteurs pour lesquels la quantité de protéine détectable mesurée à l'étape (b) est inférieure à la valeur témoin de comparaison.

Le procédé de l'invention permet aussi d'identifier des agents
20 capables d'augmenter la vitesse ou le degré de dégradation du facteur $I\kappa B\alpha$ par le protéasome des cellules de levure. De tels agents activateurs sont susceptibles d'induire ou d'augmenter la translocation du facteur NF- κ B dans le noyau cellulaire et, en conséquence, d'induire ou d'augmenter l'activation,
25 par NF- κ B, de divers gènes impliqués dans l'inflammation, des pathologies d'auto-immunité ou des cancers. Ainsi, selon ce second aspect, le procédé de criblage *in vitro* de l'invention permet de cribler des agents pro-inflammatoires. Certains des agents pro-inflammatoires sélectionnés selon le procédé sont susceptibles de revêtir un intérêt thérapeutique lorsqu'ils sont
30 utilisés à faible dose ou lorsqu'ils sont administrés pendant une courte durée, par exemple en tant qu'agents inducteurs d'une réponse immune précoce, telle que l'induction d'une réaction de résistance non spécifique à l'infection ou encore telle que l'activation des cellules présentatrices de l'antigène, pour l'initiation d'une réponse immunitaire spécifique d'un antigène, qu'elle soit à

médiation humorale ou à médiation cellulaire. Certains autres agents pro-inflammatoires sélectionnés selon le procédé de criblage *in vitro* de l'invention peuvent consister en des principes actifs connus, notamment des principes actifs de médicament, dont un effet pro-inflammatoire indésirable est identifié, et pour lesquels des précautions d'emploi particulières vis-à-vis de la santé humaine devront être observées.

Ainsi, selon un autre aspect, le procédé de criblage selon l'invention peut comprendre une étape additionnelle (d) qui consiste à sélectionner positivement les agents candidats activateurs, pour lesquels la quantité de protéine détectable mesurée à l'étape (b) est supérieure à la valeur témoin de comparaison.

Ainsi, un agent qui « module » l'ubiquitination de la protéine β -TrCP consiste (i) en un agent qui augmente ou au contraire consiste (ii) en un agent qui inhibe ou bloque la dégradation de la protéine β -TrCP qui est détectée à l'étape (b) du procédé de criblage de l'invention, par rapport à une situation témoin de dégradation de cette protéine, lorsque le procédé est réalisé en l'absence de l'agent testé.

Comme on l'aura compris, l'agent modulant l'ubiquitination de la protéine β -TrCP peut être de toute nature. Ledit agent peut être tout composé organique ou minéral, et peut être soit un agent d'origine naturelle, soit un agent produit, au moins en partie, par synthèse chimique ou biologique. Ledit agent peut être notamment un peptide ou protéine. Ledit agent englobe aussi toute molécule déjà connue pour posséder un effet biologique, notamment un effet thérapeutique, ou à l'inverse un effet toxique démontré ou suspecté pour l'organisme.

Dans le procédé de l'invention, une fois que la protéine de fusion I κ B α -protéine détectable est ubiquitinylée par le complexe SCF artificiel comprenant le polypeptide β -TrCP, ladite protéine de fusion subit une protéolyse qui est effectuée par le complexe multi-catalytique du protéasome. La quantification de la protéine détectable contenue dans la cellule de levure, à un instant donné, permet de déterminer le degré de dégradation de ladite protéine de fusion I κ B α -protéine détectable, à cet instant donné.

Selon l'invention on a montré que la sensibilité du procédé de criblage décrit ci-dessus est accrue lorsque, préalablement à la mise en contact des cellules de levure avec l'agent à tester, on favorise l'accumulation de la protéine cible de fusion I κ B α -protéine détectable dans le noyau cellulaire.

5 Ainsi, selon un premier mode de réalisation préféré du procédé ci-dessus, l'étape (a) comprend elle-même les étapes suivantes :

- (a1) cultiver les cellules de levure qui expriment dans leur noyau une protéine de fusion comprenant le polypeptide I κ B α et au moins une première protéine détectable ;
- 10 (a2) stopper l'expression de ladite protéine de fusion comprenant le polypeptide I κ B α et au moins une première protéine détectable par les cellules de levure ;
- (a3) mettre en contact les cellules de levures obtenues à la fin de l'étape (a2) avec l'agent candidat à tester.

15 L'arrêt de l'expression de la protéine de fusion I κ B α -protéine détectable, à un moment choisi, peut être facilement réalisé par l'homme du métier, en utilisant, pour transformer les cellules de levure, une cassette d'expression dans laquelle le polynucléotide codant ladite protéine de fusion est placé sous le contrôle d'un promoteur fonctionnel dans les cellules de
20 levure et dont l'activation, ou à l'inverse la répression, est induite par un agent inducteur. De nombreux promoteurs inductibles actifs dans des cellules de levure sont connus par l'homme du métier, dont certains d'entre eux sont décrits plus loin dans la description, y compris dans les exemples.

 L'accumulation de la protéine de fusion I κ B α -protéine détectable dans
25 le noyau des cellules de levure, pendant l'étape (a1) du procédé, permet l'obtention d'un fort signal de détection de la protéine détectable, au début du procédé. Ces conditions de fort signal permettent de quantifier avec une grande sensibilité la protéine détectable pendant toute la durée du procédé, au fur et à mesure de la dégradation de la protéine de fusion I κ B α -protéine
30 détectable par le protéasome, après qu'elle ait été ubiquitinylée par le complexe SCF artificiel comprenant la protéine β -TrCP. De manière évidente, plus le signal détectable de départ est fort, meilleure est la sensibilité des mesures lors de la mise en œuvre du procédé.

Selon un premier aspect du mode de réalisation ci-dessus, les cellules de levure expriment la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP durant la totalité des étapes (a1), (a2) et (a3).

5 Selon un second aspect du mode de réalisation ci-dessus, les cellules de levure expriment la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP durant la totalité des étapes (a2) et (a3) et n'expriment pas la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP durant l'étape (a1).

10 Selon ce second aspect, le contrôle de l'expression de la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP est facilement réalisé, en utilisant, pour transformer les cellules de levure, une cassette d'expression dans laquelle le polynucléotide codant la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP est placé sous le contrôle d'un promoteur fonctionnel dans les cellules de levure et dont l'activation, ou à l'inverse la répression, est induite par un agent inducteur. De nombreux promoteurs inductibles actifs dans des cellules de
15 levure sont connus par l'homme du métier, dont certains d'entre eux sont décrits plus loin dans la description, y compris dans les exemples. De manière tout à fait préférée, le promoteur inductible inclus dans la cassette d'expression codant la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP est distinct du promoteur inductible inclus dans la cassette d'expression codant
20 la protéine de fusion I κ B α -protéine détectable. Selon ce mode de réalisation préférentiel, on réalise un contrôle séparé respectivement (i) de l'expression de la protéine de fusion I κ B α -protéine détectable et (ii) de l'expression de la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP.

25 Selon ce second aspect, la protéine de fusion I κ B α -protéine détectable s'accumule dans le noyau des cellules de levure pendant l'étape (a1), en l'absence de polypeptide β -TrCP. Puis, à l'étape (a2) la protéine de fusion I κ B α -protéine détectable qui n'est plus produite est mise en présence, dans le noyau cellulaire, du complexe SCF artificiel qui comprend la protéine β -TrCP dont l'expression a été induite. Dans ce mode de réalisation du
30 procédé, on accumule d'abord la protéine de fusion cible comprenant I κ B α , puis on exprime la protéine effectrice de l'ubiquitination, à savoir la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP, laquelle va initier le processus de dégradation de la protéine de fusion I κ B α -protéine détectable. Et le processus de dégradation de la protéine de fusion I κ B α -protéine détectable,

qui peut être modulé par l'agent à tester, est mesuré à l'étape (b) du procédé de criblage de l'invention.

Selon un troisième aspect du mode de réalisation préféré du procédé de criblage de l'invention, les cellules de levure expriment la protéine
5 comprenant le polypeptide β -TrCP durant la totalité des étapes (a2) et (a3),
et

(i) n'expriment pas la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP pendant une durée prédéterminée, au début de l'étape (a1) ;

(ii) expriment la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP pendant la
10 durée restante de l'étape (a1).

Selon ce troisième aspect également, la protéine de fusion $I\kappa B\alpha$ -protéine détectable est exprimée durant la totalité de l'étape (a1) du procédé, et l'expression de ladite protéine de fusion est stoppée à l'étape (a2) du procédé.

15 Selon ce troisième aspect, on active l'expression de la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP à un moment choisi pendant la durée de l'étape (a1). Dans ces conditions, dans la partie (ii) de l'étape (a1), la protéine de fusion $I\kappa B\alpha$ -protéine détectable et la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP sont simultanément exprimées dans les cellules de
20 levure.

Selon ce troisième aspect, la protéine de fusion $I\kappa B\alpha$ -protéine détectable s'accumule en grande quantité dans le noyau des cellules de levure durant la totalité de l'étape (a1) et la protéine effectrice comprenant le polypeptide β -TrCP est exprimée précocement au cours de l'étape (a1) et
25 continue de s'accumuler durant les étapes (a2) et (a3) pendant lesquelles la protéine de fusion cible n'est plus synthétisée. Dans ces conditions, du fait de la grande quantité de la protéine effectrice comprenant le polypeptide β -TrCP accumulée dans le noyau des cellules de levure, on favorise un haut niveau de réaction d'ubiquitination de la protéine de fusion cible et donc
30 aussi une forte activité de dégradation de la protéine de fusion cible par le protéasome, ce qui accroît considérablement la sensibilité du procédé de criblage, lorsqu'on teste des agents candidats potentiellement inhibiteurs de l'ubiquitination du polypeptide $I\kappa B\alpha$.

Préférentiellement, selon ce troisième aspect du procédé de l'invention, pendant l'étape (a1), l'expression de la protéine de fusion I κ B α -protéine détectable est activée pendant une durée T1 comprise entre 0,25 heure et 10 heures, mieux entre 0,5 heure et 6 heures, et encore mieux entre
5 1 heure et 4 heures.

Puis, à un instant t2 déterminé, situé pendant la durée T1, on active l'expression de la protéine effectrice comprenant le polypeptide β -TrCP. Préférentiellement, l'instant t2 est situé entre [T1 - 8 heures] et [T1 - 0,1 heure], mieux entre [T1 - 5 heures] et [T1 - 0,25 heure], et encore mieux
10 entre [T1 - 3 heures] et [T1 - 0,5 heure], l'instant t2 étant, par définition, choisi à l'intérieur des limites de la durée T1 préalablement sélectionnée.

Puis, à la fin de la période de temps T1, c'est à dire au début de l'étape (a2), on stoppe l'expression de la protéine de fusion I κ B α -protéine détectable. A partir de cet instant, seule l'expression de la protéine effectrice
15 comprenant le polypeptide β -TrCP est maintenue activée dans les cellules de levure, et ce pour la totalité de la durée restante du procédé de criblage, c'est à dire jusqu'à la fin du procédé.

Description des modes de réalisation préférés du procédé de criblage

Les modes de réalisation préférés du procédé de criblage de
20 l'invention sont décrits ci-dessous, notamment en relation avec la description des aspects fonctionnels et structurels des divers moyens permettant la mise en œuvre dudit procédé.

De manière générale, la protéine détectable qui est comprise dans la protéine de fusion I κ B α -protéine détectable peut être de toute nature, dès
25 lors que sa présence, peut être spécifiquement détectée dans les cellules de levure avant sa protéolyse, et que la présence de formes protéolysées de la protéine détectable, notamment de fragments peptidiques produits par protéolyse de ladite protéine détectable, ne sont pas détectées par le moyen de détection spécifique qui est choisi.

30 Comme cela se comprend aisément, l'activité ubiquitine ligase du complexe protéique artificiel comprenant la protéine β -TrCP est suivie, selon le procédé de l'invention, en mesurant son effet sur la stabilité de la protéine de fusion I κ B α -protéine détectable. L'ajout de chaînes de poly-ubiquitine sur le facteur I κ B α , par le complexe SCF artificiel homme/levure, entraîne la

reconnaissance du facteur I κ B α ubiquitiné par le protéasome et sa dégradation rapide par ce dernier. Grâce à l'expression dans les cellules de levure du facteur I κ B α sous forme de protéine fusion, la dégradation de la protéine fusion contenant I κ B α peut être suivie en temps réel, par détection
5 de la protéine détectable non protéolysée. Selon la nature de la protéine détectable fusionnée à I κ B α , la dégradation de la protéine fusion peut être suivie par des techniques connues en soi, notamment des techniques de mesure de fluorescence à l'aide, soit d'un cytomètre de flux, soit d'un lecteur de microplaques, soit d'un fluorimètre, soit grâce à un microscope à
10 fluorescence, ou encore par des techniques colorimétriques, enzymatiques ou immunologiques. A titre illustratif, la protéine détectable peut être choisie parmi un antigène, une protéine fluorescente ou une protéine ayant une activité enzymatique.

Lorsque la protéine détectable consiste en un antigène, elle peut être
15 tout type d'antigène, dès lors que des anticorps spécifiques de cet antigène sont déjà accessibles ou, alternativement, peuvent être préparés, selon toute technique d'obtention d'anticorps, notamment d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux, bien connues de l'homme du métier. Préférentiellement, dans ce cas, la protéine détectable consiste en un antigène de faible taille, qui
20 n'est pas susceptible d'interférer avec la reconnaissance du facteur I κ B α par le polypeptide β -TrCP. Ainsi, préférentiellement, on utilise, comme antigène, un peptide ayant une chaîne de 7 à 100 acides aminés de longueur, mieux de 7 à 50 acides aminés de longueur, et encore mieux de 7 à 30 acides aminés de longueur, par exemple 10 acides aminés de longueur. A titre
25 illustratif, on peut utiliser l'antigène HA de séquence [NH₂-YPYDVPDYA-COOH] SEQ ID N° 17, ou encore un antigène FLAG de séquence [NH₂-DYKDDDDK-COOH] SEQ ID N° 18 (monomère FLAG) ou de séquence [NH₂-MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK-COOH] SEQ ID N° 19 (trimère FLAG). Dans ce cas, on utilise, pour quantifier la protéine détectable à l'étape (b) du procédé, un anticorps qui reconnaît spécifiquement l'antigène compris dans
30 la protéine de fusion, cet anticorps étant marqué directement ou indirectement. La quantification est alors réalisée par mesure du signal détectable produit par les complexes formés, dans les cellules de levure, entre l'anticorps marqué et la protéine de fusion I κ B α -antigène. Ainsi, à
35 l'étape (b), lorsque la première protéine détectable est un antigène, on

quantifie ladite première protéine détectable par détection des complexes formés entre ladite protéine et des anticorps la reconnaissant.

Lorsque la protéine détectable consiste en une protéine à fluorescence intrinsèque, elle est notamment choisie parmi la protéine GFP ou l'un de ses dérivés, la protéine YFP ou l'un de ses dérivés, et la protéine dsRED. Parmi les protéines dérivées de la protéine GFP, on peut utiliser notamment l'une quelconque des protéines connues sous les noms GFPMut3, Venus, Sapphire etc. Une liste illustrative des protéines GFP susceptibles d'être utilisées dans le procédé de l'invention est présentée dans le Tableau 3, à la fin de la présente description. Dans ce cas, on quantifie la protéine détectable à l'étape (b) du procédé par mesure du signal de fluorescence qui est émis par la protéine de fusion $1\kappa B\alpha$ -protéine fluorescente à l'aide de tout dispositif adapté. Ainsi, à l'étape (b), lorsque la première protéine détectable est une protéine fluorescente, on quantifie ladite protéine détectable par une mesure du signal de fluorescence émis par ladite protéine.

Lorsque la protéine détectable consiste en une protéine à activité enzymatique, ladite protéine détectable est choisie notamment parmi la luciférase et la β -lactamase. Dans ce cas, on quantifie la protéine détectable à l'étape (b) du procédé par mesure de la quantité du ou des composés produits par la conversion du substrat par l'enzyme. Lorsque le produit de l'activité enzymatique est coloré, la mesure peut être réalisée par colorimétrie. Lorsque le produit de l'activité enzymatique est fluorescent, on mesure l'intensité du signal de fluorescence qui est émis par ledit produit, à l'aide de tout dispositif de mesure de la fluorescence adapté. Ainsi, à l'étape (b), lorsque la première protéine détectable est une protéine ayant une activité enzymatique, on quantifie ladite protéine détectable par une mesure de la quantité de substrat transformé par ladite protéine.

Dans un mode de réalisation particulier du procédé de criblage selon l'invention, la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP consiste également en une protéine de fusion comprenant, outre le polypeptide β -TrCP, également une protéine détectable. Dans ce mode de réalisation particulier, on peut suivre dans le temps le niveau d'expression du polypeptide β -TrCP dans les cellules de levure, en détectant, et facultativement en quantifiant, la protéine détectable contenue dans la protéine comprenant le polypeptide β -

TrCP. Ce mode de réalisation particulier est principalement mis en œuvre lorsque l'on contrôle positivement ou négativement l'expression de la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP, aux différentes sous-étapes de l'étape (a) du procédé. La protéine détectable contenue dans le polypeptide
5 comprenant le polypeptide β -TrCP est choisie parmi un antigène, une protéine fluorescente et une protéine ayant une activité enzymatique. Préférentiellement, la protéine détectable contenue dans la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP est distincte de la protéine détectable contenue dans la protéine de fusion $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -protéine détectable, ce qui permet
10 de suivre séparément l'expression du facteur $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ et l'expression du polypeptide β -TrCP dans les cellules de levure.

Comme cela a déjà été précédemment dans la description, la dégradation du polypeptide cible $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ humain par le protéasome des cellules de levure est réalisée uniquement lorsque la protéine de fusion $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -protéine
15 détectable et la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP humain sont toutes les deux co-localisées dans le noyau des cellules de levure.

En particulier, le demandeur a montré, comme cela est illustré dans les exemples, que le facteur $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ est phosphorylé sur le résidu sérine en position 32 exclusivement dans le noyau des cellules de levure, alors qu'il ne
20 subit pas de phosphorylation dans le cytoplasme. A posteriori, l'événement de phosphorylation du résidu sérine en position 32 du facteur $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, dans les cellules de levure, permet d'expliquer, au moins partiellement, la raison pour laquelle, dans les cellules de levure, l'ubiquitination de ce facteur ne peut être réalisée que dans le noyau cellulaire.

25 En conséquence, pour réaliser le procédé de criblage de l'invention, on met en œuvre tout moyen permettant la localisation nucléaire à la fois de la protéine de fusion $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -protéine détectable et de la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP.

30 Préférentiellement, la protéine de fusion $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -protéine détectable et la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP comprennent toutes les deux un peptide permettant de localiser ces deux protéines dans le noyau des cellules de levure.

Ainsi, de manière préférée, la protéine de fusion $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -protéine détectable et la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP comprennent

toutes les deux, dans leur séquence en acides aminés, au moins un peptide de localisation nucléaire (« NLS ») qui est fonctionnel dans les cellules eucaryotes, et plus particulièrement dans les cellules de levure. Chacune des protéines comprend, indépendamment l'une de l'autre, 1, 2, 3 ou 4 peptides de localisation nucléaire. Selon un autre aspect, chacune de ces protéines comprend, indépendamment l'une de l'autre de 1 à 4 copies d'un peptide de localisation nucléaire.

Préférentiellement, le ou les peptide(s) de localisation nucléaire sont choisis parmi les peptides suivants :

- 10 - le peptide NLS dérivé du grand antigène du virus SV40 ayant la séquence en acides aminés SEQ ID N°24 ;
- le peptide NLS de la nucléoplasmine ayant la séquence en acides aminés SEQ ID N° 20 ;
- un peptide NLS du répresseur alpha 2 de levure choisi parmi les séquences SEQ ID N° 21 et SEQ ID N° 22 ;
- 15 - un peptide NLS de la protéine Gal4 de levure ayant la séquence en acides aminés SEQ ID N° 23.

Dans les exemples, la protéine de fusion I κ B α -protéine détectable et la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP comprennent toutes les deux le peptide de localisation nucléaire de séquence SEQ ID N°24.

De préférence, le polypeptide de fusion I κ B α -protéine détectable consiste en une chaîne d'acides aminés qui comprend, de l'extrémité NH₂-terminale vers l'extrémité COOH-terminale, respectivement (i) la séquence de la protéine détectable, (ii) la séquence NLS de localisation nucléaire et (iii) la séquence de I κ B α .

Tout d'abord, dans le polypeptide fusion, la séquence de la GFP et la séquence NLS peuvent être liées directement entre elles, par une liaison peptidique. Egalement, la séquence NLS et la séquence de I κ B α peuvent être liées directement entre elles, par une liaison peptidique.

30 Selon un autre aspect, la séquence de GFP et la séquence NLS peuvent être séparées, dans la séquence du polypeptide de fusion, par un premier peptide espaceur.

Selon encore un autre aspect, la séquence NLS et la séquence de I κ B α peuvent être séparées, dans la séquence du polypeptide de fusion, par un second peptide espaceur.

Avantageusement, le ou les peptide(s) espaceur(s), lorsqu'il est (sont) 5 présent(s), a (ont) une taille allant de 1 à 30 acides aminés, préférentiellement de 1 à 15 acides aminés, et de manière tout à fait préférée de 2 à 10 acides aminés de longueur.

Selon un mode de réalisation préféré, la protéine comprenant le polypeptide I κ B α consiste en la protéine de séquence en acides aminés 10 SEQ ID N°2, qui peut être codée par l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°1. La protéine de séquence SEQ ID N° 2 consiste, de l'extrémité NH₂-terminale vers l'extrémité COOH-terminale, respectivement en (i) la séquence de la protéine détectable GFP(yEGFP3) allant de l'acide aminé en position 1 jusqu'à l'acide aminé en position 240, (ii) un premier peptide 15 espaceur allant de l'acide aminé en position 241 jusqu'à l'acide aminé en position 243, (iii) le peptide NLS du grand antigène T de SV40 allant de l'acide aminé en position 244 jusqu'à l'acide aminé en position 250, (iv) un second peptide espaceur allant de l'acide aminé en position 251 jusqu'à l'acide aminé en position 255 et (v) le polypeptide I κ B α allant de l'acide 20 aminé en position 256 jusqu'à l'acide aminé en position 572. L'acide nucléique de séquence SEQ ID N°1 consiste, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', respectivement en (i) la séquence codant la protéine détectable GFP(yEGFP3) allant du nucléotide en position 1 jusqu'au nucléotide en position 714, (ii) la séquence codant un premier peptide 25 espaceur allant du nucléotide en position 715 jusqu'au nucléotide en position 729, (iii) la séquence codant le peptide NLS du grand antigène T de SV40 allant du nucléotide en position 730 jusqu'au nucléotide en position 750, (iv) la séquence codant un second peptide espaceur allant du nucléotide en position 751 jusqu'au nucléotide en position 765 et (v) la séquence codant le 30 polypeptide I κ B α allant du nucléotide en position 766 jusqu'au nucléotide en position 1719.

Préférentiellement, la protéine comprenant le polypeptide β TrCP consiste en une chaîne d'acides aminés qui comprend, de l'extrémité NH₂-terminale vers l'extrémité COOH-terminale, respectivement (i) la séquence

d'une seconde protéine détectable, (ii) la séquence NLS de localisation nucléaire, et (iii) la séquence de β TrCP.

Selon un mode de réalisation préféré, la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP consiste en la protéine de séquence en acides aminés
5 SEQ ID N° 4, qui est codée par l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°3. La protéine de séquence SEQ ID N° 4 consiste, de l'extrémité NH_2 -terminale vers l'extrémité COOH -terminale, respectivement en (i) la séquence de la protéine détectable GFP(yEGFP3) allant de l'acide aminé en position 1 jusqu'à l'acide aminé en position 240, (ii) un premier peptide espaceur allant
10 de l'acide aminé en position 241 jusqu'à l'acide aminé en position 243, (iii) le peptide NLS du grand antigène T de SV40 allant de l'acide aminé en position 244 jusqu'à l'acide aminé en position 250, (iv) un second peptide espaceur allant de l'acide aminé en position 251 jusqu'à l'acide aminé en position 255 et (v) le polypeptide β -TrCP allant de l'acide aminé en position 256 jusqu'à
15 l'acide aminé en position 860. L'acide nucléique de séquence SEQ ID N°3 consiste, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', respectivement en (i) la séquence codant la protéine détectable GFP(yEGFP3) allant du nucléotide en position 1 jusqu'au nucléotide en position 714, (ii) la séquence codant un premier peptide espaceur allant du nucléotide en position 715 jusqu'au
20 nucléotide en position 729, (iii) la séquence codant le peptide NLS du grand antigène T de SV40 allant du nucléotide en position 730 jusqu'au nucléotide en position 750, (iv) la séquence codant un second peptide espaceur allant du nucléotide en position 751 jusqu'au nucléotide en position 765 et (v) la séquence codant le polypeptide β -TrCP allant du nucléotide en position 766
25 jusqu'au nucléotide en position 2538.

Selon encore un autre aspect, le procédé de criblage selon l'invention est caractérisé en ce que les cellules de levure recombinantes sont transformées avec :

(1) un premier polynucléotide qui comprend (a) un cadre de lecture
30 ouvert codant (i) la protéine de fusion comprenant le polypeptide $1\text{kB}\alpha$, (ii) une séquence de localisation nucléaire et (iii) une première protéine détectable, et (b) une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert; et

(2) un second polynucléotide qui comprend (a) un cadre de lecture ouvert codant (i) une protéine comprenant le polypeptide β -TrCP, (ii) une séquence de localisation nucléaire, et (iii) une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert;

Le polynucléotide (1) ci-dessus peut consister en l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°1.

Le polynucléotide (2) ci-dessus peut consister en l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°3.

Acides nucléiques, vecteurs d'expression et cellules de levure transformées préférés selon l'invention.

On synthétisé selon l'invention des acides nucléiques, lesquels, lorsqu'ils sont introduits dans des cellules de levure, provoquent l'expression respectivement de la protéine de fusion I κ B α -protéine détectable et de la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP dans ces cellules, et plus particulièrement dans le noyau des cellules de levure.

Tout d'abord, chacun des acides nucléiques synthétisés comprend une séquence codante, qui est aussi désignée « cadre de lecture ouvert » ou « ORF », qui code la protéine d'intérêt, respectivement soit la protéine de fusion I κ B α -protéine détectable, soit la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP, ladite protéine d'intérêt comprenant aussi dans sa séquence au moins la séquence d'un peptide de localisation nucléaire. Des exemples illustratifs des acides nucléiques selon l'invention sont les acides nucléiques de séquence SEQ ID N°1 et SEQ ID N°3, dont la structure a été décrite précédemment dans la description.

Chacun des acides nucléiques comprend aussi une séquence régulatrice comprenant un promoteur fonctionnel dans les cellules de levure.

Selon un premier mode de réalisation préféré, le promoteur fonctionnel dans les cellules de levure consiste en un promoteur constitutif qui peut être choisi parmi les promoteurs *PGK1*, *ADH1*, *TDH3*, *LEU2* et *TEF1*.

Préférentiellement, dans le but de contrôler précisément les périodes durant lesquelles sont exprimées respectivement la protéine de fusion I κ B α -protéine détectable et la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP, chacun des acides nucléiques comprend, en tant que promoteur, un promoteur dit

« inductible », c'est à dire un promoteur fonctionnel dans les cellules de levure et qui est sensible à l'action d'un agent inducteur. On peut utiliser un promoteur lequel, lorsque l'agent inducteur est ajouté dans le milieu de culture des cellules de levure, active l'expression de la séquence codant la protéine d'intérêt placée sous son contrôle. On peut aussi utiliser un promoteur lequel, lorsque l'agent inducteur est ajouté dans le milieu de culture des cellules de levure, réprime ou bloque l'expression de la séquence codant la protéine d'intérêt placée sous son contrôle.

Ainsi, selon un second mode de réalisation préféré d'un promoteur, le promoteur inductible qui est contenu dans les acides nucléiques de l'invention est choisi parmi *CUP1*, *GAL1*, *MET3*, *MET25*, *MET28*, *SAM4* et *PHO5*.

Dans un mode de réalisation préféré, l'acide nucléique ou le polynucléotide qui code la protéine de fusion I κ B α -protéine détectable comprend la séquence régulatrice *GAL1*, qui active l'expression du cadre de lecture ouvert codant la protéine de fusion comprenant le polypeptide le polypeptide I κ B α en présence de glucose.

Ainsi, dans un mode de réalisation avantageux du procédé de criblage de l'invention, l'expression de la protéine fusion comprenant le facteur I κ B α est réalisée de manière temporaire durant l'essai de criblage. Après avoir été induite durant un temps fixé pouvant varier de 20 minutes à 24 heures, l'expression de la protéine contenant I κ B α est spécifiquement stoppée (dans une expérience connue par l'homme du métier sous le nom de « promoter shut off ») avant d'exposer les cellules aux molécules devant être criblées. Cet arrêt de l'expression est obtenu par l'addition (ou la suppression) dans le milieu de culture d'une molécule pouvant réprimer l'activité du promoteur contrôlant l'expression de la protéine tripartite contenant I κ B α .

Ainsi, lorsque la protéine de fusion I κ B α -protéine détectable est exprimée sous le contrôle du promoteur du gène *GAL1*, alors l'expression de ce promoteur est réprimée en ajoutant du glucose à la concentration finale de 2 % dans le milieu de culture. L'arrêt de la néo-synthèse de la protéine de fusion comprenant I κ B α permet de mesurer sa stabilité en temps réel, en déterminant par exemple la fluorescence des cellules de levure au cours du temps après l'arrêt de synthèse, dans le mode de réalisation dans lequel

« inductible », c'est à dire un promoteur fonctionnel dans les cellules de levure et qui est sensible à l'action d'un agent inducteur. On peut utiliser un promoteur lequel, lorsque l'agent inducteur est ajouté dans le milieu de culture des cellules de levure, active l'expression de la séquence codant la protéine d'intérêt placée sous son contrôle. On peut aussi utiliser un promoteur lequel, lorsque l'agent inducteur est ajouté dans le milieu de culture des cellules de levure, réprime ou bloque l'expression de la séquence codant la protéine d'intérêt placée sous son contrôle.

Ainsi, selon un second mode de réalisation préféré d'un promoteur, le promoteur inductible qui est contenu dans les acides nucléiques de l'invention est choisi parmi *CUP1*, *GAL1*, *MET3*, *MET25*, *MET28*, *SAM4* et *PHO5*.

Dans un mode de réalisation préféré, l'acide nucléique ou le polynucléotide qui code la protéine de fusion $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -protéine détectable comprend la séquence régulatrice *GAL1*, qui active l'expression du cadre de lecture ouvert codant la protéine de fusion comprenant le polypeptide le polypeptide $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ en présence de galactose.

Ainsi, dans un mode de réalisation avantageux du procédé de criblage de l'invention, l'expression de la protéine fusion comprenant le facteur $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ est réalisée de manière temporaire durant l'essai de criblage. Après avoir été induite durant un temps fixé pouvant varier de 20 minutes à 24 heures, l'expression de la protéine contenant $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ est spécifiquement stoppée (dans une expérience connue par l'homme du métier sous le nom de « promoter shut off ») avant d'exposer les cellules aux molécules devant être criblées. Cet arrêt de l'expression est obtenu par l'addition (ou la suppression) dans le milieu de culture d'une molécule pouvant réprimer l'activité du promoteur contrôlant l'expression de la protéine tripartite contenant $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$.

Ainsi, lorsque la protéine de fusion $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -protéine détectable est exprimée sous le contrôle du promoteur du gène *GAL1*, alors l'expression de ce promoteur est réprimée en ajoutant du glucose à la concentration finale de 2 % dans le milieu de culture. L'arrêt de la néo-synthèse de la protéine de fusion comprenant $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ permet de mesurer sa stabilité en temps réel, en déterminant par exemple la fluorescence des cellules de levure au cours du temps après l'arrêt de synthèse, dans le mode de réalisation dans lequel

ladite protéine de fusion contient une protéine détectable à fluorescence intrinsèque, comme la GFP ou une protéine dérivée de la GFP.

Dans un autre mode particulièrement avantageux du procédé de criblage selon l'invention, l'expression temporaire de la protéine fusion
5 comprenant le facteur $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ est associée à une expression également temporaire de la protéine comprenant le polypeptide $\beta\text{-TrCP}$. Dans ce mode de réalisation, la protéine de fusion comprenant le polypeptide $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ est exprimée pendant la période de temps $T1$ choisie, par exemple en utilisant des cellules de levure qui expriment la protéine de fusion comprenant le
10 polypeptide $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ sous le contrôle du promoteur *GAL1* et qui sont cultivées en présence de 0, 5 à 4 % de galactose pendant la durée $T1$. A l'instant $t2$, l'expression de la protéine comprenant le polypeptide $\beta\text{-TrCP}$ est induite. Cette induction est par exemple obtenue, chez des cellules exprimant la protéine contenant $\beta\text{-TrCP}$ sous le contrôle du promoteur du gène *CUP1*, en
15 ajoutant dans le milieu de culture une concentration de sulfate de cuivre comprise entre 0.05 mM et 5 mM. A la fin de la période de temps $T1$, l'expression de la protéine de fusion comprenant $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ est stoppée en ajoutant dans le milieu de culture du glucose à une concentration comprise entre 0.5 et 2 %. Cet ajout de glucose n'a pas d'effet sur l'expression de la
20 protéine comprenant $\beta\text{-TrCP}$ à partir du promoteur du gène *CUP1*. Ainsi dans ce mode de mise œuvre du procédé, l'accumulation de l'ubiquitine ligase comprenant $\beta\text{-TrCP}$ est poursuivie, alors que la néo-synthèse de la protéine de fusion comprenant $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ est stoppée.

Ainsi, dans un mode de réalisation particulier du procédé de criblage
25 selon l'invention, l'acide nucléique ou le polynucléotide qui code la protéine comprenant le polypeptide $\beta\text{-TrCP}$ comprend la séquence régulatrice *CUP1*, qui active l'expression du cadre de lecture ouvert codant une protéine comprenant le polypeptide $\beta\text{-TrCP}$ en présence de sulfate de cuivre.

Ainsi, l'invention a aussi pour objet une cassette d'expression
30 fonctionnelle dans les cellules de levure comprenant un polynucléotide codant qui comprend un cadre de lecture ouvert codant la protéine de fusion comprenant le polypeptide le polypeptide $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ et au moins une première protéine détectable, et une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert.

Une telle cassette d'expression peut notamment consister en l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°1 selon l'invention, qui code la protéine de fusion GFP-NLS-I κ B α de séquence SEQ ID N°2.

5 L'invention concerne aussi une cassette d'expression fonctionnelle dans les cellules de levure comprenant un polynucléotide qui comprend un cadre de lecture ouvert codant une protéine comprenant le polypeptide β -TrCP et une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert.

10 Une telle cassette d'expression peut notamment comprendre l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°3 selon l'invention, qui code la protéine de fusion GFP-NLS- β TrCP de séquence SEQ ID N°4.

Selon un premier mode de réalisation préféré d'une telle cassette d'expression, la séquence régulatrice comprend un promoteur inductible fonctionnel dans les cellules de levure, tel qu'un promoteur choisi
15 parmi les promoteurs *PGK1*, *ADH1*, *TDH3*, *LEU2* et *TEF1*.

Selon un second mode préféré d'une telle cassette d'expression, dans l'une ou l'autre des cassettes d'expression ci-dessus, ou dans les deux, la séquence régulatrice contenue dans ledit polynucléotide, la séquence régulatrice contenue dans le second polynucléotide, ou les deux séquences
20 régulatrices, comprenne(nt) un promoteur fonctionnel dans les cellules de levure et qui est sensible à l'action d'un agent inducteur, qui est aussi appelé promoteur inductible.

De manière tout à fait préférée, le promoteur inductible fonctionnel dans les cellules de levure est choisi parmi *CUP1*, *GAL1*, *MET3*, *MET25*,
25 *MET28*, *SAM4* et *PHO5*.

Selon un autre mode de réalisation avantageux du procédé de criblage selon l'invention, les cellules de levure sont transformées par (i) l'acide nucléique ou le polynucléotide comprenant la séquence codant la protéine de fusion I κ B α -protéine détectable ainsi que par (ii) l'acide
30 nucléique ou le polynucléotide codant la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP, qui se présentent sous une forme non intégrée, par exemple sous la forme de vecteurs fonctionnels dans les cellules de levure et qui portent au moins une origine de répllication fonctionnelle dans les cellules de levure.

Dans encore une autre mode de réalisation du procédé de criblage
35 selon l'invention, les cellules de levure recombinantes possèdent l'acide

nucléique ou le polynucléotide comprenant la séquence codant la protéine de fusion I κ B α -protéine détectable ainsi que l'acide nucléique ou le polynucléotide codant la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP sous une forme intégrée dans leur génome, comme cela est illustré dans les
5 exemples.

De manière générale, pour la mise en œuvre du procédé de criblage de l'invention, il est avantageux d'utiliser des cellules de levures qui possèdent une bonne perméabilité membranaire, notamment une bonne perméabilité membranaire pour les agents à tester par le procédé.

10 Pour la mise en œuvre du mode de réalisation préféré du procédé de criblage de l'invention dans lequel l'expression des deux protéines d'intérêt est réalisée sous le contrôle de promoteurs inductibles, il est également avantageux d'utiliser des cellules de levures qui possèdent une bonne perméabilité membranaire pour les composés inducteurs vis-à-vis desquels
15 lesdits promoteurs inductibles sont sensibles

Ainsi, dans un autre mode de réalisation préféré du procédé de criblage de l'invention, on utilise des souches de levure dont le génome comprend une à plusieurs mutations qui augmentent la perméabilité aux produits à tester, telles que des mutations inactivant les gènes *PDR1* et
20 *PDR3*, deux gènes codant des facteurs transcriptionnels qui chez la levure contrôlent l'expression de transporteurs insérés dans la membrane plasmique (Vidal et al, 1999, Nourani et al, 1997).

Préférentiellement, on utilise des souches de levure possédant le fond génétique de la souche W303 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* décrite
25 par Bailis et al. (1990), ou tout autre souche caractérisée de la dite levure *Saccharomyces cerevisiae*.

La transformation des cellules de levure par de l'ADN exogène est préférentiellement en utilisant des techniques connues de l'homme du métier, notamment la technique décrite par Schiestl et al. (1989). Les
30 constructions des différentes souches de levure ont été réalisées en employant des techniques de génétique (croisement, sporulation dissection des asques et analyse phénotypique des spores) connues et décrites notamment par Sherman et al. (1979) et les techniques de génétique inverse décrites notamment par Rothstein (1991).

Conformément à l'invention, les levures sont transformées préférentiellement par des plasmides construits selon des techniques de biologie moléculaire classiques, notamment selon les protocoles décrits par Sambrook et al. (1989) et Ausubel et al. (1990-2004).

5 Ainsi, un autre objet de l'invention consiste en un vecteur d'expression caractérisé en ce qu'il comprend une cassette d'expression telle que définie dans la présente description.

Un premier vecteur conforme à l'invention est le vecteur pCSY226-NLS-I κ B α qui est décrit dans les exemples, et qui a servi à la construction de
10 la souche de levure CYS135 déposée à la Collection Nationale de Cultures de microorganismes de l'Institut Pasteur de Paris sous le numéro d'accès I-3187.

Un second vecteur conforme à l'invention est le vecteur pCSY226-NLS- β -TrCP qui est décrit dans les exemples, et qui a servi à la construction
15 de la souche de levure CYS135 déposée à la Collection Nationale de Cultures de microorganismes de l'Institut Pasteur de Paris sous le numéro d'accès I-3187.

La présente invention est également relative à une souche de levure recombinante comprenant, sous une forme intégrée dans son génome,

20 (i) un premier polynucléotide qui comprend un cadre de lecture ouvert codant la protéine de fusion comprenant le polypeptide le polypeptide I κ B α et au moins une première protéine détectable, et une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert; et

25 (ii) un second polynucléotide qui comprend un cadre de lecture ouvert codant une protéine comprenant le polypeptide β -TrCP et une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert;

En particulier, l'invention est relative à une souche de levure recombinante conforme à la définition ci-dessus, qui consiste en la souche
30 de levure CYS135 déposée à la Collection Nationale de Cultures de microorganismes de l'Institut Pasteur de Paris (CNCM) sous le numéro d'accès I-3187.

L'invention concerne aussi une trousse ou kit pour le criblage d'agents
35 modulant l'ubiquitination de la protéine I κ B α par un complexe protéique

fonctionnel ubiquitine ligase comprenant la protéine β -TrCP, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 5 (i) un premier vecteur d'expression comprenant une cassette d'expression codant la protéine de fusion comprenant le polypeptide I κ B α telle que définie ci-dessus ; et
- (ii) un second vecteur d'expression comprenant une cassette d'expression codant la protéine comprenant le polypeptide BTrCP telle que définie ci-dessus.

10 L'invention est aussi relative à une trousse ou kit pour le criblage d'agents modulant l'ubiquitination de la protéine I κ B α par un complexe protéique fonctionnel ubiquitine ligase comprenant la protéine β -TrCP, caractérisé en ce qu'il comprend des cellules de levures recombinantes comprenant, sous une forme insérée dans leur génome, respectivement :

- 15 (i) une cassette d'expression codant la protéine de fusion comprenant le polypeptide I κ B α telle que définie ci-dessus ; et
- (ii) une cassette d'expression codant la protéine comprenant le polypeptide BTrCP telle que définie ci-dessus.

Préférentiellement, la trousse ou kit ci-dessus comprend des cellules de levures recombinantes de la souche de levure CYS 135 déposée à la 20 CNCM sous le numéro d'accès II-3187.

Le procédé de criblage selon l'invention, permet de visualiser l'activité de l'ubiquitine ligase SCF ^{β -TrCP} vis à vis du facteur I κ B α humain, substrat de la voie ubiquitine protéasome de dégradation des protéines. Ce procédé est particulièrement avantageux pour cribler des molécules ou agents aptes à 25 agir sur les pathologies liées à l'activation des facteurs NF- κ B et aux dysfonctionnements de la voie NF- κ B chez l'homme tels que les syndromes inflammatoires et immuns, certains cancers, certaines maladies comme la « reperfusion injury » et les infections fongiques, bactériennes et virales.

Les principaux avantages du procédé de criblage de l'invention sont 30 notamment les suivants :

- la simplicité de mise en œuvre: l'induction de l'activité de l'ubiquitine ligase SCF ^{β -TrCP} vis-à-vis du facteur I κ B α est réalisée simplement grâce à l'expression contrôlée des facteurs humains I κ B α et β -TrCP dans les cellules de levure. De plus, lorsque le facteur I κ B α est exprimé en tant que protéine 35 hybride en fusion avec une protéine à fluorescence intrinsèque, telle que la

GFP, l'activité de l'ubiquitine ligase $SCF^{\beta-TrCP}$ artificielle vis-à-vis du facteur $I\kappa B\alpha$ est directement mesurée par la quantification de la fluorescence émise par la protéine hybride. De même lorsque le facteur $I\kappa B\alpha$ est exprimé en tant que protéine hybride en fusion avec une protéine telle que la luciférase, l'activité de l'ubiquitine ligase $SCF^{\beta-TrCP}$ artificielle vis-à-vis du facteur $I\kappa B\alpha$ est directement mesurée par la quantification de la luminescence émise par la protéine hybride en présence d'un substrat comme la fluorescéine.

- l'adéquation avec un contexte thérapeutique: l'activité de l'ubiquitine ligase $SCF^{\beta-TrCP}$ artificielle vis-à-vis du facteur $I\kappa B\alpha$ est suivie selon un test fonctionnel réalisé dans des cellules entières. Le procédé de criblage *in vitro* selon l'invention permet donc de sélectionner des molécules capables d'activer ou d'inhiber la dégradation d' $I\kappa B\alpha$ dans un contexte semblable à celui de leur usage thérapeutique final.

- la spécificité: bien que réalisé *in vitro* dans la cellule, le procédé de criblage selon l'invention est spécifique, car il repose sur la co-expression, dans un organisme hétérologue à l'organisme humain, des deux protéines humaines $I\kappa B\alpha$ et $\beta-TrCP$. Les molécules sélectionnées grâce au procédé de criblage de l'invention seront spécifiques de ce couple ubiquitine ligase $\beta-TrCP$ / protéine substrat $I\kappa B\alpha$, et ne seront donc pas des molécules sélectionnées en raison, par exemple, de leur capacité à interférer avec l'une des nombreuses voies de signalisation induisant la dégradation d' $I\kappa B\alpha$ dans les cellules humaines. En effet, lors de la mise en œuvre du procédé de criblage selon l'invention, la dégradation d' $I\kappa B\alpha$, par l'intermédiaire de l'ubiquitine ligase $SCF^{\beta-TrCP}$ artificielle, est induite par une voie métabolique tout à fait artificielle et totalement reproductible, comme par exemple, l'ajout de glucose pour bloquer l'activité du promoteur *GAL1*, lorsque $I\kappa B\alpha$ est exprimé sous le contrôle de ce promoteur.

- la stabilité des souches de levure recombinantes: les techniques d'intégration dans un endroit choisi d'un chromosome de levure, et de remplacement ciblé de gènes permettent la construction de souches de levures recombinantes exprimant les protéines humaines hybrides contenant soit $I\kappa B\alpha$ soit $\beta-TrCP$ à partir des chromosomes de la levure. Ces souches de levure recombinantes sont donc génétiquement stables et peuvent être multipliées et conservées indéfiniment.

- la rapidité de croissance et de criblage: la levure est un micro-organisme à croissance rapide et rendement élevé. En particulier, le procédé de criblage de l'invention est préférentiellement réalisé en cultivant les cellules de levure dans un milieu de culture complet, dans lequel la croissance des cellules de levure est particulièrement rapide et le rendement particulièrement élevé, ce qui permet l'obtention d'une grande quantité de cellules de levure recombinantes pour la réalisation simultanée d'un nombre important de tests de criblage.

- le faible coût: la levure est un microorganisme dont la culture, le stockage et la caractérisation sont peu onéreux,

- l'automatisation du procédé de criblage de l'invention: la levure est un microorganisme dont la culture, réalisée dans un faible volume de milieu, à température basse, en atmosphère classique, dans l'air, est tout particulièrement adapté à l'automatisation (robotisation) des procédés de criblage.

Le procédés de criblage selon l'invention sont utiles notamment pour sélectionner et caractériser des agents actifs tels que des agents anti-inflammatoires, anticancéreux, anti-viraux, des agents contre des infections fongiques, bactériennes ou virales.

La présente invention est en outre illustrée, sans pour autant être limitée, par les figures et les exemples suivants.

FIGURES

La **figure 1** illustre la possibilité pour les protéines Skp1 de levure et β -TrCP humaine d'interagir dans les cellules de levure.

En abscisse : les plasmides présents dans les cellules de levure transformées ; En ordonnée, l'activité β -galactosidase, exprimée en nanomoles de substrat transformé par minute et par mg de protéines cellulaires.

La **figure 2** illustre les localisations dans les cellules de levures des protéines humaines $\kappa B\alpha$ et β -TrCP selon qu'elles sont fusionnées ou non à une séquence NLS de SV40.

Ligne supérieure : clichés de microscopie à fluorescence de coloration de l'ADN des noyaux cellulaires avec le colorant Hoechst 333-42.

Ligne inférieure : clichés de microscopie à fluorescence permettant de localiser dans les cellules l'expression de la GFP.

A : Cellules transformées par le vecteur GFP-NLS- β -TrCP ; B : cellules transformées par le vecteur GFP- β -TrCP ; C : cellules transformée par le vecteur GFP-NLS-I κ B α ; D : cellules transformées par le vecteur GFP-I κ B α .

La **figure 3** illustre comment l'adressage de la protéine humaine I κ B α dans le noyau des cellules de levure induit sa phosphorylation sur les sérines 32 et 36.

La figure représente un gel d'électrophorèse des protéines cellulaires des souches de levure recombinantes CYS22 et CYS126, respectivement.

La **figure 4** illustre par une analyse au microscope d'épifluorescence, la dégradation de la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I κ B α dans des cellules de levure lorsque celles-ci expriment également la protéine fusion tripartite Flag-NLS- β -TrCP.

Les figures 4A à 4D représentent des clichés de microscopie par fluorescence : ligne supérieure, coloration de l'ADN des noyaux cellulaires avec le colorant Hoechst 333-42 ; ligne inférieure, clichés de microscopie à fluorescence permettant de localiser dans les cellules l'expression de la GFP.

Figure 4A : résultats obtenus avec la souche de levure recombinante CYS22 ; Figure 4B : résultats obtenus avec la souche de levure recombinante CYS61.

Figure 4C : résultats obtenus avec la souche de levure recombinante CYS126.

Figure 4D : résultats obtenus avec la souche de levure recombinante CYS135.

En ordonnées : les différents temps après l'ajout de glucose dans les cultures cellulaires, exprimés en minutes.

La **figure 5** illustre par une quantification de la fluorescence émise, la dégradation de la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I κ B α dans des cellules de levure lorsque celles-ci expriment ou non la protéine fusion tripartite Flag-NLS- β -TrCP.

Les résultats sont illustrés pour les souches de levure recombinantes CYS135, CYS126, CYS61 et CYS22, respectivement, qui sont indiquées par des encadrés sur la figure.

5 En abscisse : temps écoulé après l'addition de glucose dans les cultures cellulaires, exprimé en minutes ; en ordonnée : moyenne de l'intensité du signal de fluorescence, exprimée en unités arbitraires de fluorescence.

La **figure 6** illustre par une analyse biochimique de type Western Blotting, la dégradation de la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I κ B α dans des cellules
10 de levure lorsque celles-ci expriment également la protéine fusion tripartite Flag-NLS- β -TrCP.

Clichés de gels d'immuno-empreinte (« Western blotting ») révélés avec des anticorps anti-GFP et des anticorps anti-peptide FLAG

15 En abscisse : temps écoulé après l'addition de glucose dans les cultures cellulaires, exprimé en minutes.

Les résultats sont illustrés pour les souches de levure recombinantes suivantes : CYS22 (Figure 6A), CYS61 (Figure 6B), CYS126 (Figure 6C) et CYS135 (Figure 6D).

20 La **figure 7** illustre par une analyse biochimique de type Western blotting, la dégradation de la protéine fusion tripartite mutante GFP-NLS-I κ B α [S3236A] dans laquelle les sites de phosphorylation Ser32 et Ser36 ont été remplacés par des résidus Ala, mutations qui dans des cellules humaines rendent la protéine non-dégradable.

25 Clichés de gels d'immuno-empreinte (« Western blotting ») révélés avec des anticorps anti-GFP et des anticorps anti-peptide FLAG

En abscisse : temps écoulé après l'addition de glucose dans les cultures cellulaires, exprimé en minutes.

30 Les résultats sont illustrés pour les souches de levure recombinantes suivantes : CYS138 (Figure 7A) et CYS139 (Figure 7B).

La **figure 8** illustre par une analyse au microscope d'épifluorescence, la dégradation de la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I κ B α [S3236A] dans des cellules de levure lorsque celles-ci expriment également la protéine fusion
35 tripartite Flag-NLS- β -TrCP.

Les figures 8A et 8B représentent des clichés de microscopie à fluorescence : ligne supérieure, coloration de l'ADN des noyaux cellulaires avec le colorant Hoechst 333-42 ; ligne inférieure, clichés de microscopie à fluorescence permettant de localiser dans les cellules l'expression de la GFP.

Figure 8A : résultats obtenus avec la souche de levure recombinante CYS138 ; Figure 8B : résultats obtenus avec la souche de levure recombinante CYS139.

En ordonnées : les différents temps après l'ajout de glucose dans les cultures cellulaires, exprimés en minutes.

La **figure 9** illustre par une quantification de la fluorescence émise, la dégradation de la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I κ B α [S3236A] dans les souches de levure décrites ci-dessus.

Les résultats sont illustrés pour les souches de levure recombinantes CYS138 et CYS139, respectivement, qui sont indiquées par des encadrés sur la figure.

En abscisse : temps écoulé après l'addition de glucose dans les cultures cellulaires, exprimé en minutes ; en ordonnée : moyenne de l'intensité du signal de fluorescence, exprimée en unités arbitraires de fluorescence.

EXEMPLES

Exemples 1 à 3 : Construction des vecteurs recombinants selon l'invention.

A. MATERIEL ET METHODES DES EXEMPLES 1 A 3.

A.1. Récapitulatif des séquences de polynucléotide utilisées

La séquence de la protéine I κ B α est celle décrite dans Strausberg et al. (PNAS (1999), **99**(26) : 16899-16903).

La séquence de la sous unité réceptrice β -TrCP du complexe ubiquitine ligase SCF $^{\beta$ -TrCP est celle décrite dans Yaron et al. (Nature (1998) **396**(6711) : 590-594).

La séquence du gène *GFP* d'*Aequora victoria* et de son produit la Green Fluorescent Protein mut3 dont la séquence est optimisée pour

l'expression en levures (*yEGFP3*) (désignée ci-après sous le terme **GFP**) est celle décrite dans Cormack et al. (Gene (1996) **173** (1) : 33-38).

La séquence de localisation nucléaire « NLS » du grand antigène T codée par le virus SV40 est la traduction de la séquence nucléique ;

5 « 5' ACCTCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTCGAATT 3' » (SEQ ID N°25).

La séquence du plasmide pRS306 est celle décrite dans Sikorski et Hieter (Genetics (1989) **122**(1) : 19-27).

La séquence du plasmide pRS304 est celle décrite dans Sikorski et Hieter (Genetics (1989) **122**(1) : 19-27).

10 La séquence du plasmide pRS314 est celle décrite dans Sikorski et Hieter (Genetics (1989) **122**(1) : 19-27).

La séquence du plasmide pRS316 est celle décrite dans Sikorski et Hieter (Genetics (1989) **122**(1) : 19-27).

La séquence du plasmide pSH18-34 qui contient quatre opérateurs LexA placé en amont du gène LacZ est celle décrite par Hanes et Brent (Cell
15 (1989), **57**:1275-1293)

La séquence du plasmide pLexSkp1-1, qui permet l'expression de la protéine Skp1 de levure fusionnée à la protéine bactérienne LexA, est celle décrite dans Patton et al. (Genes & Dev (1998), **12** :692-705)

20 La séquence du plasmide pGAD β TrCP, qui permet l'expression de la protéine humaine β -TrCP fusionnée au domaine activateur du facteur transcriptionnel Gal4 de levure est celle décrite dans Margottin et al. (Molec. Cell (1998), **1** :565-574).

La séquence du promoteur du gène *GAL1* de la levure *S. cerevisiae*
25 utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite par Johnston et Davis (Mol. Cell. Biol. (1984) **4** (8) : 1440-1448).

La séquence du promoteur du gène *MET3* de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite dans Cherest et al. (Mol. Gen. Genet. (1987) **210** (2) : 307-313).

La séquence du promoteur du gène *MET28* de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite dans Kuras et al. (EMBO J. (1996) **15**(10) : 2519-2529).

5 La séquence du promoteur du gène *TEF1* de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite par Schaaff-Gerstenschlager et al. (Eur. J. Biochem. (1993) **217** (1) : 487-492).

La séquence du promoteur du gène *SAM4* de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite par Thomas et al. (J. Biol. Chem. (2000) **275**(52) : 40718-40724).

10 La séquence du promoteur du gène *MET25* de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite dans Kerjan et al. (Nucleic Acids Res.(1986) **14**(20) : 7861-7871).

La séquence du promoteur du gène *PHO5* de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite par Feldmann et al.
15 (EMBO J. (1994) **13**(24) : 5795-5809).

La séquence du promoteur du gène *CUP1* de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite par Karin et al. (PNAS (1984) **81**(2) : 337-341).

La séquence du promoteur du gène *PGK1* de la levure *S. cerevisiae*
20 utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite par Bolle et al. (Yeast (1992) **8**(3) : 205-213).

La séquence du promoteur du gène *ADH1* de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite par Bennetzen et Hall (J. Biol. Chem. (1982) **257**(6) : 3018-3025).

25 La séquence du promoteur du gène *TDH3* de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite par Arroyo et al. Non publié (1996) soumission directe au MIPS).

La séquence du promoteur du gène *LEU2* de la levure *S. cerevisiae* utilisé dans les descriptions qui suivent est celle décrite par Rad et al. (Yeast
30 (1991) **7**(5) : 533-538).

A.2. Conventions utilisées

Les descriptions sont faites en utilisant la nomenclature et les règles typographiques en usage dans la communauté des biologistes spécialistes de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

- 5 - le nom de la forme sauvage d'un gène est donné en majuscule italique ; exemple : *GAL1*.
- le nom d'une forme mutante d'un gène est donné en minuscule italique, le numéro d'allèle si il est connu est précisé à la suite d'un tiret ; exemple *cup1-1*.
- 10 - le nom d'un allèle inactivé d'un gène est donné en minuscule suivi de 2 fois deux points suivi du nom du gène inactivant ex *ppr1::TRP1* (dans cet exemple le gène inactivé *ppr1* a été interrompu par le gène actif *TRP1*).
- Alternativement, le nom d'un gène inactivé peut être donné par le
- 15 symbole « *delta* » ; exemple *gal4Δ*.
- le nom de la protéine est celui du gène qui la code est donné en minuscule, excepté la première lettre qui est en majuscule ex *Gal4* (alternativement on peut utiliser le même symbole suivi d'un p ; exemple *Gal4p*).

20

A.3. Remarques préliminaires concernant la construction des plasmides

- L'ensemble des plasmides a été construit par des techniques de biologie moléculaire classiques selon des protocoles décrits par Sambrook et
- 25 al. (in *Molecular Cloning, Laboratory Manual*, 2nd edition, (1989), Cold Spring Harbor, N. Y.) et Ausubel et al., (in *Current Protocols in Molecular Biology*, (1990-2004), John Wiley and Sons Inc, N.Y.). Le clonage, la propagation et la production d'ADN plasmidiques ont été réalisés dans la souche d'*Escherichia coli* DH10B.

30

EXEMPLE 1 : Construction des plasmides permettant l'expression chez la levure des protéines fusions GFP-IκBα et GFP-NLS-IκBα.

Les plasmides suivants permettent l'expression chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* de dérivés de la protéine humaine IκBα fusionnés

à un variant de la Green Fluorescente Protéine (*GFP*) d'*Aequora victoria*. Selon le plasmide construit, les protéines fusions construites comprennent ou non la séquence de localisation nucléaire du grand antigène T du virus SV40. L'introduction de cette séquence permet l'adressage dans le

5 compartiment nucléaire des protéines fusion qui la comprennent.

Un fragment de 620 paires de bases (pb) correspondant au promoteur du gène *GAL1* (pGAL1) de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été amplifié par Polymerase Chain Reaction (PCR) à partir d'ADN génomique

10 d'une souche sauvage de *S.cerevisiae* X2180-1A, en utilisant les oligonucléotides « pGAL1(Asp)Forw » de séquence

5'-GCTGGGTACCTTAATAATCATATTACATGGCATT-3' [SEQ ID N°6] et

« pGAL1(EcoRI)Rev » de séquence

5'-GGCGGAATTCTATAGTTTTTCTCCTTGACGTTA-3' [SEQ ID N°7].

15 Le fragment obtenu a été digéré par les enzymes de restriction *Asp718I* et *EcoRI* et inséré dans le plasmide navette *S.cerevisiae-E.coli* pRS306 préalablement digéré par les enzymes *Asp718I* et *EcoRI*, produisant le vecteur pRS306-pGAL1.

Un fragment de 720 paires de bases (pb) correspondant à un variant

20 du gène codant pour la Green Fluorescent Protein (*GFP*) d'*Aequora victoria*, dont la séquence est optimisée pour l'expression en levures (*yEGFP3*), a été amplifié par Polymerase Chain Reaction (PCR) à partir du vecteur pUC19-*yEGFP3*, en utilisant les oligonucléotides « GFPEcoRI5' » de séquence

5'-GGTCGGAATTCATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTC-3' [SEQ ID N° 8] et

25 « PBamHI(SmaI/SrfI PstI)3' » de séquence

5'-GGCGGGATCCGCCCCGGGCTCTGCAGTTTGTACAATTCATCCATACC-3' [SEQ ID N°9]. Le fragment obtenu a été digéré par les enzymes de restriction *BamHI* et *EcoRI* et inséré dans le plasmide pRS306-pGAL1 préalablement digéré par les enzymes *BamHI* et *EcoRI*, produisant le

30 vecteur pRS306-pGAL1-*yEGFP3*.

Un fragment de 340 paires de bases (pb) correspondant au terminateur du gène *ADH1* (*tADH1*) de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été amplifié par Polymérase Chain Reaction (PCR) à partir d'ADN

génomique d'une souche sauvage de *S.cerevisiae* X2180-1A, en utilisant les oligonucléotides « TermADH1(NotI/BstXI)5' » de séquence

5'-GGCGGCGGCCGCCACCGCGGTGGGCGAATTTCTTATGATTTATG-3'

[SEQ ID N°10] et « TermADH1(SacI)3' » de séquence

5 5'-GGCGGAGCTCTGGAAGAACGATTACAACAG-3' [SEQ ID N°11].

Le fragment obtenu a été digéré par les enzymes de restriction *SacI* et *NotI* et inséré dans le plasmide pRS306-pGAL1-yEGFP3 préalablement digéré par les enzymes *SacI* et *NotI*, produisant le vecteur pCSY226.

10 Le gène codant pour la protéine I κ B α a été purifiée à partir du plasmide pGad1318-I κ Ba par digestion par l'enzyme de restriction *XbaI* suivi d'un traitement avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I afin de transformer l'extrémité cohésive en 3' du fragment en extrémité franche, puis d'une seconde digestion par l'enzyme de restriction *BamHI* pour l'extrémité 5'

15 du gène. Le fragment a été cloné dans le plasmide pCSY226 préparé par une digestion par l'enzyme de restriction *KpnI*, suivie d'un traitement avec le fragment de Klenow, puis d'une digestion par l'enzyme de restriction *BamHI*. Le vecteur produit a été appelé pCSY226-I κ B α .

Une version de ce vecteur contient en plus la séquence d'adressage nucléaire NLS. Celle-ci a été obtenue en synthétisant une paire d'oligonucléotides complémentaire de séquence

« NLS-5' » : 5'ACCTCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTCGAATT-3' [SEQ ID N°12], et

25 « NLS-3' » : 5'-AATTCGACCTTTCTCTTCTTTTTTGGAGGT-3' [SEQ ID N°26].

réhybridés pour former un ADN double brin. Ce fragment d'ADN a ensuite été incorporé dans le vecteur pCSY226-I κ B α digéré par l'enzyme de restriction *SacI* pour donner le vecteur pCSY226-NLS-I κ B α .

30 **EXEMPLE 2 : Construction des plasmides permettant l'expression chez la levure des protéines fusions GFP- β -TrCP et GFP-NLS- β -TrCP.**

Les plasmides suivants permettent l'expression chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* de dérivés de la protéine humaine β -TrCP fusionnés à un variant de la Green Fluorescente Protéine (GFP) d'*Aequora*

victoria. Selon le plasmide construit, les protéines fusions construites comprennent ou non la séquence de localisation nucléaire du grand antigène T du virus SV40. L'introduction de cette séquence permet l'adressage dans le compartiment nucléaire des protéines fusion qui la comprennent.

- 5 Un fragment de 620 paires de bases (pb) correspondant au promoteur du gène *GAL1* (pGAL1) de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été amplifié par Polymerase Chain Reaction (PCR) à partir d'ADN génomique d'une souche sauvage de *S.cerevisiae* X2180-1A, en utilisant les oligonucléotides « pGAL1(Asp)Forw » de séquence
- 10 5'-GCTGGGTACCTTAATAATCATATTACATGGCATT-3' [SEQ ID N°6] et « pGAL1(EcoRI)Rev » de séquence
- 5'-GGCGGAATTCTATAGTTTTTCTCCTTGACGTTA-3' [SEQ ID N°7].

- Le fragment obtenu a été digéré par les enzymes de restriction *Asp718I* et *EcoRI* et inséré dans le plasmide navette *S.cerevisiae-E.coli* pRS306 préalablement digéré par les enzymes *Asp718I* et *EcoRI*, produisant
- 15 le vecteur pRS306-pGAL1.

- Un fragment de 720 paires de bases (pb) correspondant à un variant du gène codant pour la Green Fluorescent Protein (GFP) d'*Aequora victoria*, dont la séquence est optimisée pour l'expression en levures (*yEGFP3*), a été
- 20 amplifié par Polymerase Chain Reaction (PCR) à partir du vecteur pUC19-*yEGFP3*, en utilisant les oligonucléotides « GFPEcoRI5' » de séquence
- 5'-GGTCGGAATTCATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTC-3' [SEQ ID N°8] et « GFPBamHI(SmaI/SrfI PstI)3' » de séquence
- 5'-GGCGGGATCCGCCCCGGGCTCTGCAGTTTGTACAATTCATCCATACC-
- 25 3' [SEQ ID N°9].

Le fragment obtenu a été digéré par les enzymes de restriction *BamHI* et *EcoRI* et inséré dans le plasmide pRS306-pGAL1 préalablement digéré par les enzymes *BamHI* et *EcoRI*, produisant le vecteur pRS306-pGAL1-*yEGFP3*.

- 30 Un fragment de 340 paires de bases (pb) correspondant au terminateur du gène *ADH1* (*tADH1*) de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été amplifié par Polymérase Chain Reaction (PCR) à partir d'ADN génomique d'une souche sauvage de *S.cerevisiae* X2180-1A, en utilisant les oligonucléotides « TermADH1(NotI/BstXI)5' » de séquence 5'-

GGCGGCGGCCGCCACCGCGGTGGGCGAATTTCTTATGATTATG-3'

[SEQ ID N°10] et « TermADH1(SacI)3' » de séquence

5'-GGCGGAGCTCTGGAAGAACGATTACAACAG-3' [SEQ ID N°11].

Le fragment obtenu a été digéré par les enzymes de restriction *SacI* et
5 *NotI* et inséré dans le plasmide pRS306-pGAL1-yEGFP3 préalablement
digéré par les enzymes *SacI* et *NotI*, produisant le vecteur pCSY226.

Le gène codant pour la protéine β TrCP a été purifiée à partir du
plasmide pGad1318- β TrCP par digestion par les enzymes de restriction
BamHI et *NotI*. Le fragment a été cloné dans le plasmide pCSY226 préparé
10 par une digestion par les enzymes de restriction *BamHI* et *NotI*. Le vecteur
produit a été appelé pCSY226- β TrCP.

Une version de ce vecteur contient en plus la séquence d'adressage
nucléaire NLS. Celle-ci a été obtenue en synthétisant une paire
d'oligonucléotides complémentaire de séquence

15 « NLS-5' » : 5'-ACCTCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTCGAATT-3' [SEQ ID
N°12], et

« NLS-3' » : 5'-AATTCGACCTTTCTCTTCTTTTTTGGAGGT-3' [SEQ ID
N°26]

réhybridés pour former un ADN double brin. Ce fragment d'ADN a ensuite
20 été incorporé dans le vecteur pCSY226- β TrCP digéré par l'enzyme de
restriction *ScrFI* pour donner le vecteur pCSY226-NLS- β TrCP.

EXEMPLE 3 : Construction des plasmides permettant l'expression chez la levure des protéines fusions GFP- β -TrCP et GFP-NLS- β -TrCP.

Les plasmides suivants permettent l'expression chez la levure
25 *Saccharomyces cerevisiae* de dérivés de la protéine β -TrCP comprenant une
répétition de trois motifs antigénique Flag à leur extrémité amino-terminale.
L'expression de ces protéines fusions est induite en cultivant les cellules de
levures hébergeant ces plasmides en présence de 2 à 5 % de galactose
dans le milieu de culture pendant 1 à 10 heures.

30 Un fragment de 700 paires de bases (pb) correspondant au promoteur
du gène *PGK1* (pPGK1) de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été
amplifié par Polymerase Chain Reaction (PCR) à partir d'ADN génomique
d'une souche sauvage de *S.cerevisiae* X2180-1A, en utilisant les
oligonucléotides « pPGK1-Asp718-5' » de séquence

5'-GGCGGGTACCGTGAGTAAGGAAAGAGTGAGG-3' [SEQ ID N°13] et
« pPGK-EcoRI-3' » de séquence

5'-GGCGGAATTCTGTTTTATATTTGTTGTAAAAAG-3' [SEQ ID N°14].

Le fragment obtenu a été digéré par les enzymes de restriction
5 Asp718I et EcoRI et inséré dans le plasmide navette *S.cerevisiae-E.coli*
pRS304 préalablement digéré par les enzymes Asp718I et EcoRI, produisant
le vecteur pRS304-pPGK1.

Un fragment de 100 paires de bases (pb) correspondant à une
succession de 3 séquences rapporteuses FLAG (3FLAG) a été amplifié par
10 Polymerase Chain Reaction (PCR) à partir du vecteur p3XFLAG-myc-CMV-
24 5Sigma Aldrich), en utilisant les oligonucléotides « 3FLAG-EcoRI-5' » de
séquence

5'-GGCGGAATTCATGGACTACAAAGACCATGACGG-3' [SEQ ID N°15] et
« 3FLAGBamHI(SmaI/SrfI PstI)3' » de séquence

15 5'-GGCGGGATCCGCCCGGGCTCTGCAGCTTGTTCATCGTCATCCTTGTA-
3' [SEQ ID N°16]..

Le fragment obtenu a été digéré par les enzymes de restriction BamHI
et EcoRI et inséré dans le plasmide pRS304-pPGK1 préalablement digéré
par les enzymes BamHI et EcoRI, produisant le vecteur pRS304-pPGK1-
20 3FLAG.

Un fragment de 340 paires de bases (pb) correspondant au
terminateur du gène *ADH1* (tADH1) de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a
été amplifié par Polymérase Chain Reaction (PCR) à partir d'ADN
génomique d'une souche sauvage de *S.cerevisiae* X2180-1A, en utilisant les
25 oligonucléotides « TermADH1(NotI/BstXI)5' » de séquence 5'-
GGCGGCGGCCGCCACCGCGGTGGGCGAATTTCTTATGATTTATG-3'
[SEQ ID N°10] et « TermADH1(SacI)3' » de séquence

5'-GGCGGAGCTCTGGAAGAACGATTACAACAG-3' [SEQ ID N°11].

Le fragment obtenu a été digéré par les enzymes de restriction SacI et
30 NotI et inséré dans le plasmide pRS304-pPGK1-3FLAG préalablement
digéré par les enzymes SacI et NotI, produisant le vecteur pCSY614.

Le gène codant pour la protéine β TrCP a été purifiée à partir du
plasmide pGad1318- β TrCP par digestion par les enzymes de restriction
*Bam*HI et *Not*I. Le fragment a été cloné dans le plasmide pCSY614 préparé

par une digestion par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Nof*I. Le vecteur produit a été appelé pCSY614- β TrCP.

Une version de ce vecteur contient en plus la séquence d'adressage nucléaire NLS. Celle-ci a été obtenue en synthétisant une paire
5 d'oligonucléotides complémentaire de séquence
5'ACCTCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTCTGAATT-3' [SEQ ID N°12].
réhybridés pour former un ADN double brin. Ce fragment d'ADN a ensuite
été incorporé dans le vecteur pCSY614- β TrCP digéré par l'enzyme de
restriction *Scr*FI pour donner le vecteur pCSY614-NLS- β TrCP.

10

Exemples 4 à 12 : Mise au point du procédé de criblage selon l'invention.

15 **EXEMPLE 4 : Interaction entre les protéines Skp1 de levure et β -TrCP humaine dans les cellules de levure.**

L'interaction entre les protéines Skp1 et β -TrCP est visualisée par la technique du double hybride Bartel et al. (in Cellular Interactions in Development : a practical approach (1991), Oxford University Press, Oxford, pp153-179). Des cellules de levure ont été simultanément transformées par
20 le plasmide pGAD- β TrCP, qui permet l'expression de la protéine humaine β -TrCP fusionnée au domaine activateur Gal4, par le plasmide pLexSkp1-1 qui permet l'expression de la protéine de levure Skp1 fusionnée au domaine de fixation à l'ADN de la protéine bactérienne LexA, et par le plasmide pSH18-34 qui comprend le gène rapporteur LacZ codant la β -galactosidase,
25 placé sous le contrôle d'opérateurs LexA. La mesure de l'activité β -galactosidase dans des extraits cellulaires réalisées dans de telles cellules démontre que l'expression de ce gène rapporteur est induite par un facteur
15, en comparaison de son expression chez des cellules n'exprimant que l'une des deux protéines de fusion décrites ci-dessus. Cette induction de
30 l'expression du gène rapporteur indique que la protéine Skp1 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* est capable d'interagir avec la protéine β -TrCP humaine. L'activité β -galactosidase est exprimée en nmoles de substrat transformé par minute et par mg de protéines (nmoles/ min /mg).

EXEMPLE 5 : localisation, dans les cellules de levure, des protéines humaines I κ B α et β -TrCP selon qu'elles sont fusionnées ou non à une séquence NLS de SV40.

Des cellules de levures comportant des plasmides permettant l'expression des protéines hybrides soit GFP-I κ B α , soit GFP-NLS-I κ B α , soit GFP- β -TrCP, soit GFP-NLS- β -TrCP à partir du promoteur GAL1 ont été cultivées en présence de galactose 2 % pendant 2 heures et ont été ensuite observées en microscopie à fluorescence. La position du noyau a été révélée en employant un indicateur coloré spécifique du noyau, le Hoescht 333-42.

10

EXEMPLE 6 : Phosphorylation de la protéine I κ B α dans le noyau des cellules de levure.

L'exemple 6 illustre comment l'adressage de la protéine humaine I κ B α dans le noyau des cellules de levure induit sa phosphorylation sur les sérines 32 et 36.

15

Des cellules exprimant soit la protéine fusion GFP-I κ B α , soit la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I κ B α à partir du promoteur GAL1 sont cultivées en milieu minimum en présence de 2% galactose pendant 2 heures. Les protéines de ces cellules sont alors préparées selon le protocole décrit par Kuras et al. (Mol. Cell (2002), **10**:69-80). Les protéines sont ensuite analysées par la technique de Western blotting à l'aide premièrement, d'anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine GFP (indiquée « GFP-I κ B α ») et deuxièmement, d'anticorps reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée sur la sérine 32 de la protéine humaine I κ B α (indiquée « P-I κ B α »). Un contrôle de la quantité de protéines totales déposée dans chaque puit a été réalisé en analysant ces mêmes protéines à l'aide d'anticorps reconnaissant spécifiquement la Lysyl-ARNt-synthase de levure (indiquée par « LysRS »). Les protéines issues de la souche de levure parentale n'exprimant aucune protéine fusion (indiquée « contrôle ») servent de témoin de spécificité.

20
25
30

EXEMPLE 7 : Dégradation de la protéine GFP-NLS-I κ B α

L'exemple 7 illustre par une analyse au microscope d'épifluorescence, la dégradation de la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I κ B α dans des

cellules de levure lorsque celles-ci expriment également la protéine fusion tripartite Flag-NLS- β -TrCP.

Toutes les souches employées ont été cultivées et analysées en microscopie à fluorescence de manière identique. Les cellules ont été
5 cultivées en milieu riche en présence de galactose comme source de carbone pendant 120 minutes. Au temps $t=0$, du glucose 2 % est ajouté à la culture et les cellules sont observées au microscope à épifluorescence (microscope à fluorescence Nikon Eclipse équipé d'un filtre Omega XF116). Toutes les images ont été enregistrées en employant une caméra
10 Hamamatsu® en employant des réglages identiques et analysées avec le logiciel LUCIA G, juste avant ($t = 0$) et 10, 20, 30 et 60 minutes après l'addition de glucose. La fluorescence des protéines fusions GFP-I κ B α ou GFP-NLS-I κ B α est indiquée « GFP ». La position du noyau (indiquée « DNA ») dans les cellules a été révélée en employant un indicateur coloré
15 spécifique du noyau, le Hoescht 333-42.

A) souche de levure CYS22 (*MATa*, *his3*, *leu2*, *trp1*, *ura3::pGAL1-GFP-I κ B α ::URA3*) exprimant la protéine fusion GFP-I κ B α sans NLS et localisée dans le cytoplasme des cellules de levure;

B) souche de levure CYS61 (*MATa*, *his3*, *leu2*, *ura3::pGAL1-GFP-I κ B α ::URA3*, *trp1::pGAL1-3Flag- β TrCP::TRP1*) exprimant les protéines
20 fusions GFP-I κ B α et Flag- β -TrCP, localisées dans le cytoplasme des cellules de levure;

C) souche de levure CYS126 (*MATa*, *his3*, *leu2*, *trp1*, *ura3::pGAL1-GFP-NLS-I κ B α ::URA3*) exprimant la protéine fusion GFP-NLS-I κ B α localisée dans
25 le noyau des cellules de levure;

D) souche de levure CYS135 (*MATa*, *his3*, *leu2*, *ura3::pGAL1-GFP-NLS-I κ B α ::URA3*, *trp1::pGAL1-3Flag-NLS- β TrCP::TRP1*) exprimant les protéines fusions GFP-NLS-I κ B α et Flag-NLS- β -TrCP localisées dans le noyau des
30 cellules de levure.

EXEMPLE 8 : Dégradation de GFP-NLS-I κ B α avec ou non co-expression de Flag-NLS- β -TrCP (Résultats par fluorescence).

L'exemple 8 illustre par une quantification de la fluorescence émise, la dégradation de la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I κ B α dans des cellules

de levure lorsque celles-ci expriment ou non la protéine fusion tripartite Flag-NLS- β -TrCP.

Les souches de levure identiques à celles décrites dans la figure 4, et cultivées dans les mêmes conditions que celles décrites figure 4, ont été analysées par microscopie à fluorescence. Pour chaque souche, la fluorescence de 200 cellules (au moins) a été mesurée juste avant ($t=0$) et 10, 20, 30 et 60 minutes après l'addition de glucose, à l'aide du logiciel LUCIA G. Les résultats sont donnés en quantité de fluorescence mesurée par cellule en unité arbitraire.

EXEMPLE 9 : Dégradation de GFP-NLS-I κ B α avec ou non co-expression de Flag-NLS- β -TrCP (Résultats d'immuno-empreinte)

L'exemple 9 illustre par une analyse biochimique de type Western Blotting, la dégradation de la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I κ B α dans des cellules de levure lorsque celles-ci expriment également la protéine fusion tripartite Flag-NLS- β -TrCP. Toutes les souches employées ont été cultivées et analysées de manière identique. Les cellules ont été cultivées en milieu riche en présence de galactose comme source de carbone pendant 120 minutes. Au temps $t=0$, du glucose 2 % est ajouté à la culture et les protéines totales sont préparées juste avant ($t=0$) et 10, 20, 30 et 60 minutes après l'addition de glucose. Ces protéines sont analysées par la technique de Western blotting en employant un anticorps reconnaissant la partie GFP des protéines fusions contenant I κ B α (indiquée « GFP-NLS-I κ B α ») et un anticorps reconnaissant la partie Flag de la protéine fusion Flag-NLS- β -TrCP (indiquée « Flag-NLS- β -TrCP »). Un contrôle de la quantité de protéines déposée dans chaque puit est réalisé en analysant les mêmes protéines à l'aide d'anticorps reconnaissant la Lysyl-ARNt-synthase de levure (indiquée « LysRS »). Les protéines issues de la souche de levure parentale n'exprimant aucune protéine fusion (indiquée « contrôle ») servent de témoin de spécificité.

A) souche de levure CYS22 (*MATa*, *his3*, *leu2*, *trp1*, *ura3::pGAL1-GFP-I κ B α ::URA3*) exprimant la protéine fusion GFP-I κ B α sans NLS et localisée dans le cytoplasme des cellules de levure;

B) souche de levure CYS61 (*MATa*, *his3*, *leu2*, *ura3::pGAL1-GFP-I κ B α ::URA3*, *trp1::pGAL1-3Flag- β TrCP::TRP1*) exprimant les protéines

fusions GFP-I κ B α et Flag- β -TrCP, localisées dans le cytoplasme des cellules de levure;

C) souche de levure CYS126 (*MATa*, *his3*, *leu2*, *trp1*, *ura3::pGAL1-GFP-NLS-I κ B α ::URA3*) exprimant la protéine fusion GFP-NLS-I κ B α localisée dans le noyau des cellules de levure;

D) souche de levure CYS135 (*MATa*, *his3*, *leu2*, *ura3::pGAL1-GFP-NLS-I κ B α ::URA3*, *trp1::pGAL1-3Flag-NLS- β -TrCP::TRP1*) exprimant les protéines fusions GFP-NLS-I κ B α et Flag-NLS- β -TrCP localisées dans le noyau des cellules de levure.

EXEMPLE 10 : Dégradation de GFP-NLS-I κ B α mutée sur les résidus sérine 32 et 36 avec ou non co-expression de Flag-NLS- β -TrCP (Résultats d'immuno-empreinte)

L'exemple 10 illustre par une analyse biochimique de type Western blotting, la dégradation de la protéine fusion tripartite mutante GFP-NLS-I κ B α [S3236A] dans laquelle les sites de phosphorylation Ser32 et Ser36 ont été remplacés par des résidus Ala, mutations qui dans des cellules humaines rendent la protéine non-dégradable. L'analyse a été faite dans des cellules de levure exprimant également ou non la protéine fusion tripartite Flag-NLS- β -TrCP. Toutes les souches employées ont été cultivées et analysées de manière identique. Les cellules ont été cultivées en milieu riche en présence de galactose comme source de carbone pendant 120 minutes. Au temps t=0, du glucose 2 % est ajouté à la culture et les protéines totales sont préparées juste avant (t=0) et 10, 20, 30 et 60 minutes après l'addition de glucose. Ces protéines sont analysées par la technique de Western blotting en employant un anticorps reconnaissant la partie GFP des protéines fusions contenant I κ B α [S3236A] (indiqué « GFP-NLS-I κ B α [S3236A] ») et un anti-corps reconnaissant la partie Flag des protéines fusions Flag-NLS- β -TrCP (indiqué « Flag-NLS- β -TrCP »). Un contrôle de la quantité de protéines déposée dans chaque puit est réalisé en analysant les mêmes protéines à l'aide d'anticorps reconnaissant la Lysyl-ARNt-synthase de levure (indiquée « LysRS »). Les protéines issues de la souche de levure parentale n'exprimant aucune protéine fusion (indiquée « contrôle ») servent de témoin de spécificité.

A) souche de levure CYS138 (*MATa*, *his3*, *leu2*, *trp1*, *ura3::pGAL1-GFP-NLS-I κ B α [S3236A]::URA3*) exprimant la protéine fusion mutante GFP-NLS-I κ B α [S3236A] localisée dans le noyau des cellules de levure;

5 B) souche de levure CYS139 (*MATa*, *his3*, *leu2*, *ura3::pGAL1-GFP-NLS-I κ B α [S3236A]::URA3*, *trp1::pGAL1-3Flag-NLS- β TrCP::TRP1*) exprimant les protéines fusions GFP-NLS-I κ B α [S3236A] et Flag-NLS- β -TrCP localisées dans le noyau des cellules de levure.

10 **EXEMPLE 11 : Dégradation de GFP-NLS-I κ B α avec ou non co-expression de Flag-NLS- β -TrCP (Résultats par fluorescence)**

L'exemple 11 illustre par une analyse au microscope d'épifluorescence, la dégradation de la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I κ B α [S3236A] dans des cellules de levure lorsque celles-ci expriment également la protéine fusion tripartite Flag-NLS- β -TrCP. Les 2 souches
15 employées (CYS138 et CYS139) ont été cultivées et analysées en microscopie à fluorescence de manière identique. Les cellules sont observées au microscope à épifluorescence (microscope à fluorescence Nikon Eclipse équipé d'un filtre Omega XF116. Toutes les images ont été enregistrées en employant une caméra Hamamatsu® en employant des
20 réglages identiques et analysées avec le logiciel LUCIA G, juste avant ($t=0$) et 10, 20, 30 et 60 minutes après l'addition de glucose. La fluorescence des protéines fusions GFP-I κ B α ou GFP-NLS-I κ B α est indiquée « GFP ». La position du noyau (indiquée « DNA ») dans les cellules a été révélée en employant un indicateur coloré spécifique du noyau, le Hoescht 333-42.

25 **EXEMPLE 12 : Dégradation de GFP-NLS-I κ B α avec ou non co-expression de Flag-NLS- β -TrCP (Résultats par fluorescence)**

L'exemple 12 illustre par une quantification de la fluorescence émise, la dégradation de la protéine fusion tripartite GFP-NLS-I κ B α [S3236A] dans
30 les souches de levure décrites ci-dessus. Pour chaque souche, la fluorescence de 200 cellules (au moins) a été mesurée juste avant ($t=0$) et 10, 20, 30 et 60 minutes après l'addition de glucose à l'aide du logiciel LUCIA G. Les résultats sont donnés en quantité de fluorescence mesurée par cellule en unité arbitraire.

35

Tableau 1 : Génotype des souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* construites pour les besoins de la présente invention.

Souche	Génotype
CC788-2B	<i>MATa, his3, leu2, ura3, trp1.</i>
CYS22	<i>MATa, his3, leu2, trp1, ura3::pGAL1-GFP-IκBα::URA3</i>
CYS61	<i>MATa, his3, leu2, ura3::pGAL1-GFP-IκBα::URA3,</i> <i>trp1::pGAL1-3Flag-βTrCP::TRP1</i>
CYS122	<i>MATa, his3, leu2, trp1, ura3::pGAL1-GFP-βTrCP::URA3</i>
CYS123	<i>MATa, his3, leu2, trp1, ura3::pGAL1-GFP-NLS-βTrCP::URA3</i>
CYS126	<i>MATa, his3, leu2, trp1, ura3::pGAL1-GFP-NLS-IκBα::URA3</i>
CYS135	<i>MATa, his3, leu2, ura3::pGAL1-GFP-NLS-IκBα::URA3,</i> <i>trp1::pGAL1-3Flag-NLS-βTrCP::TRP1</i>
CYS138	<i>MATa, his3, leu2, trp1, ura3::pGAL1-GFP-NLS-</i> <i>IκBα[S3236A]::URA3</i>
CYS139	<i>MATa, his3, leu2, ura3::pGAL1-GFP-NLS-</i> <i>IκBα[S3236A]::URA3, trp1::pGAL1-3Flag-NLS-βTrCP::TRP1</i>

TABLEAU 2 (SEQUENCES)

SEQ ID N°	Type	Description
1	ADN	GFP-NLS-IkB α
2	Protéine	GFP-NLS-IkB α
3	ADN	GFP-NLS- β TrCP
4	Protéine	GFP-NLS- β TrCP
5	ADN	Séquence NLS du grand antigène T du virus SV40
6-16	ADN	Amorces
17	Protéine	Antigène HA
18	Protéine	Monomère FLAG
19	Protéine	Trimère FLAG
20	Protéine	NLS Nucléoplasmine
21	Protéine	NLS répresseur alpha 2 (1)
22	Protéine	NLS répresseur alpha 2 (2)
23	Protéine	NLS Gal4
24	ADN	NLS Ag T SV40
25	ADN	Amorce

Tableau 3 : Liste des GFP utilisables selon l'invention

[illegible]

REFERENCES

- Arroyo et al. (Non publié (1996) soumission directe au MIPS).
- Ausubel et al. (in Current Protocols in Molecular Biology, (1990-2004), John
 5 Wiley and Sons Inc, N.Y.).
- Bailis et al., Genetics (1990), **126**:535-547)
- Ballard, Immunol Res. (2001), **23**:157-166
- Bartel et al. (in Cellular Interactions in Development : a practical approach
 (1991), Oxford University Press, Oxford, pp 153-179).
- 10 Baud et Karin, Trends Cell Biol. (2001), **11** :372-377
- Ben Neriah, Nat Immunol. (2002), **3**:20-26
- Bennetzen et Hall (J. Biol. Chem. (1982) **257**(6) : 3018-3025).
- Bolle et al. (Yeast (1992) **8**(3) : 205-213).
- Cormack et al. (Gene (1996) **173** (1) : 33-38).
- 15 Hanes et Brent (Cell (1989), **57** :1275-1293).
- Hanes et Brent (Cell (1989), **57**:1275-1293)
- Hay et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. (1999) **354**:1601-1609
- Johnston et Davis (Mol. Cell. Biol. (1984) **4** (8) : 1440-1448).
- Karin et al. (PNAS (1984) **81**(2) : 337-341).
- 20 Kerjan et al. (Nucleic Acids Res.(1986) **14**(20) : 7861-7871).
- Kroll et al., J. Biol. Chem. (1999), **274**:7941-7945
- Kroll et al., J. Biol. Chem. (1999), **274**:7941-7945
- Kuras et al. (EMBO J. (1996) **15**(10) : 2519-2529).
- Kuras et al. (Mol. Cell (2002), **10** :69-80).
- 25 Lewis et Manning, Curr. Opin. Chem. Biol. (1999) **3**: 489-494
- Magnani et al., Curr. Drug Targets. (2000) **1**:387-99
- Margottin et al. (Molec. Cell (1998), **1** :565-574).
- Margottin et al. (Molec. Cell (1998), **1**:565-574).
- Nourani et al., Mol. Cell. Biol. (1997), **20**:7881-7892).
- 30 Patton et al. (Genes & Dev (1998), **12** :692-705)
- Patton et al. Genes & Dev (1998), **12** :692-705.
- Rad et al. (Yeast (1991) **7**(5) : 533-538).
- Rothstein, in *Methods in Enzymology*, (1991), **194**:281-301

- Sambrook et al. (in *Molecular Cloning, Laboratory Manual*, 2nd edition, (1989), Cold Spring Harbor, N. Y.)
- Schiestl et al. (*Curr. Genet.* (1989), **16**:339-346
- Sherman et al., in *Methods in Yeast Genetics : a Laboratory Manual*, (1979),
- 5 Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sikorski et Hieter (*Genetics* (1989) **122**(1) : 19-27).
- Strausberg et al. (*PNAS* (1999), **99**(26) : 16899-16903
- Thomas et al. (*J. Biol. Chem.* (2000) **275**(52) : 40718-40724).
- Vidal et al., *Trends Biotechnol.*, (1999), **17**:374-381
- 10 Winston et al., *Genes Dev.* (1999), **13**:270-283
- Winston et al., *Genes Dev.* (1999), **13**:270-283
- Yaron et al. (*Nature* (1998) **396**(6711) : 590-594).

REVENDECATIONS

1. Procédé pour le criblage d'agents modulant l'ubiquitination de la protéine I κ B α par un complexe protéique fonctionnel ubiquitine ligase comprenant la protéine β -TrCP, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :
- 5 (a) mettre en contact un agent candidat à tester avec des cellules de levure recombinantes qui expriment dans leur noyau :
- (i) une protéine de fusion comprenant le polypeptide I κ B α et au moins une première protéine détectable ; et
- 10 (ii) une protéine comprenant le polypeptide β -TrCP ;
- (b) quantifier ladite première protéine détectable dans les cellules de levure, à la fin d'au moins une période de temps prédéterminée après la mise en contact de l'agent candidat avec lesdites cellules ;
- (c) comparer la valeur obtenue à l'étape (b) avec une valeur témoin
- 15 obtenue lorsque l'étape (a) est réalisée en l'absence de l'agent candidat.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape (a) comprend les étapes suivantes :
- (a1) cultiver les cellules de levure qui expriment dans leur noyau une
- 20 protéine de fusion comprenant le polypeptide I κ B α et au moins une première protéine détectable ;
- (a2) stopper l'expression de ladite protéine de fusion comprenant le polypeptide I κ B α et au moins une première protéine détectable par les cellules de levure ;
- 25 (a3) mettre en contact les cellules de levures obtenues à la fin de l'étape (a2) avec l'agent candidat à tester.
3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les cellules de levure expriment la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP durant la
- 30 totalité des étapes (a1), (a2) et (a3).
4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les cellules de levure expriment la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP durant la totalité des étapes (a2) et (a3) et n'expriment pas la protéine comprenant le
- 35 polypeptide β -TrCP durant l'étape (a1).

5. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les cellules de levure expriment la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP durant la totalité des étapes (a2) et (a3), et
- 5 (i) n'expriment pas la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP pendant une durée prédéterminée, au début de l'étape (a1) ;
(ii) expriment la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP pendant la durée restante de l'étape (a1).
- 10 6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la protéine détectable comprise dans la protéine de fusion comprenant le polypeptide $1\kappa B\alpha$ est choisie parmi un antigène, une protéine fluorescente et une protéine ayant une activité enzymatique.
- 15 7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la protéine détectable consiste en une protéine fluorescente choisie parmi la protéine GFP ou l'un de ses dérivés, la protéine YFP ou l'un de ses dérivés, et la protéine dsRED.
- 20 8. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la protéine détectable consiste en une protéine ayant une activité enzymatique choisie parmi la luciférase et la β -lactamase.
- 25 9. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la protéine détectable consiste en un antigène choisi parmi le peptide Ha et le peptide Flag.
- 30 10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la protéine comprenant le polypeptide β -TrCP consiste en une protéine de fusion comprenant aussi une seconde protéine détectable.
- 35 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la seconde protéine détectable comprise dans la protéine de fusion comprenant le polypeptide β -TrCP est choisie parmi un antigène, une protéine fluorescente et une protéine ayant une activité enzymatique.

12. Procédé selon l'une des revendications 10 et 11, caractérisé en ce que (i) la première protéine détectable comprise dans la protéine de fusion comprenant le polypeptide $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ et (ii) la seconde protéine détectable
5 comprise dans la protéine de fusion comprenant le polypeptide $\beta\text{-TrCP}$ sont distinctes l'une de l'autre.
13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que la protéine comprenant le polypeptide $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ comprend de plus un peptide de
10 localisation nucléaire.
14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que la protéine comprenant le polypeptide $\beta\text{-TrCP}$ comprend de plus un peptide de localisation nucléaire.
15
15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que la protéine comprenant le polypeptide $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ consiste en la protéine de séquence SEQ ID N°2.
- 20 16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 15 ; caractérisé en ce que la protéine comprenant le polypeptide $\beta\text{-TrCP}$ consiste en la protéine de séquence SEQ ID N° 4.
- 25 17. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'à l'étape (b), lorsque la première protéine détectable est un antigène, on quantifie ladite première protéine détectable par détection des complexes formés entre ladite protéine et des anticorps la reconnaissant.
- 30 18. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'à l'étape (b), lorsque la première protéine détectable est une protéine fluorescente, on quantifie ladite protéine détectable par une mesure du signal de fluorescence émis par ladite protéine.
- 35 19. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'à l'étape (b), lorsque la première protéine détectable est une protéine ayant

une activité enzymatique, on quantifie ladite protéine détectable par une mesure de la quantité de substrat transformé par ladite protéine.

20. Procédé selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisé en ce que les
5 cellules de levures recombinantes sont transformées avec :

respectivement :

(1) un premier polynucléotide qui comprend (a) un cadre de lecture
ouvert codant (i) la protéine de fusion comprenant le polypeptide le
polypeptide I κ B α et (iii) une première protéine détectable, et une
10 séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige
l'expression dudit cadre de lecture ouvert; et

(2) un second polynucléotide qui comprend (a) un cadre de lecture
ouvert codant (i) une protéine comprenant le polypeptide β -TrCP, (ii)
une séquence de localisation nucléaire et (iii) une séquence régulatrice
15 fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit
cadre de lecture ouvert;

21. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que la séquence
régulatrice contenue dans le premier polynucléotide, la séquence régulatrice
20 contenue dans le second polynucléotide, ou les deux séquences
régulatrices, comprennent un promoteur fonctionnel dans les cellules de
levure et qui est sensible à l'action d'un agent inducteur.

22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce le promoteur
25 inductible fonctionnel dans les cellules de levure est choisi parmi *PGK1*,
ADH1, *TDH3*, *LEU2* et *TEF1*.

23. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce le promoteur
inductible fonctionnel dans les cellules de levure est choisi parmi *CUP1*,
30 *GAL1*, *MET3*, *MET25*, *MET28*, *SAM4* et *PHO5*.

24. Procédé selon l'une des revendications 20 à 23, caractérisé en ce que le
premier polynucléotide comprend la séquence régulatrice *GAL1*, qui active
l'expression du cadre de lecture ouvert codant la protéine de fusion
35 comprenant le polypeptide le polypeptide I κ B α en présence de glucose.

une activité enzymatique, on quantifie ladite protéine détectable par une mesure de la quantité de substrat transformé par ladite protéine.

20. Procédé selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisé en ce que les
5 cellules de levures recombinantes sont transformées avec :

respectivement :

(1) un premier polynucléotide qui comprend (a) un cadre de lecture
ouvert codant (i) la protéine de fusion comprenant le polypeptide I κ B α
et (iii) une première protéine détectable, et (b) une séquence régulatrice
10 fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit
cadre de lecture ouvert; et

(2) un second polynucléotide qui comprend (a) un cadre de lecture
ouvert codant (i) une protéine comprenant le polypeptide β -TrCP, (ii)
une séquence de localisation nucléaire et (iii) une séquence régulatrice
15 fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit
cadre de lecture ouvert;

21. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que la séquence
régulatrice contenue dans le premier polynucléotide, la séquence régulatrice
20 contenue dans le second polynucléotide, ou les deux séquences
régulatrices, comprennent un promoteur fonctionnel dans les cellules de
levure et qui est sensible à l'action d'un agent inducteur.

22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce le promoteur
25 inductible fonctionnel dans les cellules de levure est choisi parmi *PGK1*,
ADH1, *TDH3*, *LEU2* et *TEF1*.

23. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce le promoteur
inductible fonctionnel dans les cellules de levure est choisi parmi *CUP1*,
30 *GAL1*, *MET3*, *MET25*, *MET28*, *SAM4* et *PHO5*.

24. Procédé selon l'une des revendications 20 à 23, caractérisé en ce que le
premier polynucléotide comprend la séquence régulatrice *GAL1*, qui active
l'expression du cadre de lecture ouvert codant la protéine de fusion
35 comprenant le polypeptide le polypeptide I κ B α en présence de galactose.

25. Procédé selon la revendication 20 à 23, caractérisé en ce que le second polynucléotide comprend la séquence régulatrice *CUP1*, qui active l'expression du cadre de lecture ouvert codant une protéine comprenant le polypeptide β -TrCP en présence de sulfate de cuivre.

26. Procédé selon l'une des revendications 20 à 25, caractérisé en ce que les cellules de levure recombinantes possèdent le premier et le second polynucléotide sous une forme insérée dans leur génome.

27. Procédé selon l'une des revendications 1 à 26, caractérisé en ce que les cellules de levure recombinantes possèdent dans leur génome une forme inactivée d'un ou plusieurs gènes contrôlant l'expression de protéines transporteurs insérées dans la membrane plasmique.

28. Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que le ou les gènes inactivés sont choisis parmi les gènes *PDR1* et *PDR3*.

29. Cassette d'expression fonctionnelle dans les cellules de levure comprenant un polynucléotide codant qui comprend un cadre de lecture ouvert codant la protéine de fusion comprenant le polypeptide le polypeptide λ CB α et au moins une première protéine détectable, et une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert.

30. Cassette d'expression fonctionnelle dans les cellules de levure comprenant un polynucléotide qui comprend un cadre de lecture ouvert codant une protéine comprenant le polypeptide β -TrCP et une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert.

31. Cassette d'expression selon l'une des revendications 29 et 30, caractérisée en ce que la séquence régulatrice contenue dans ledit polynucléotide, la séquence régulatrice contenue dans le second polynucléotide, ou les deux séquences régulatrices, comprennent un

25. Procédé selon l'une des revendications 20 à 23, caractérisé en ce que le second polynucléotide comprend la séquence régulatrice *CUP1*, qui active l'expression du cadre de lecture ouvert codant une protéine comprenant le polypeptide β -TrCP en présence de sulfate de cuivre.

26. Procédé selon l'une des revendications 20 à 25, caractérisé en ce que les cellules de levure recombinantes possèdent le premier et le second polynucléotide sous une forme insérée dans leur génome.

27. Procédé selon l'une des revendications 1 à 26, caractérisé en ce que les cellules de levure recombinantes possèdent dans leur génome une forme inactivée d'un ou plusieurs gènes contrôlant l'expression de protéines transporteurs insérées dans la membrane plasmique.

28. Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que le ou les gènes inactivés sont choisis parmi les gènes *PDR1* et *PDR3*.

29. Cassette d'expression fonctionnelle dans les cellules de levure comprenant un polynucléotide codant qui comprend un cadre de lecture ouvert codant la protéine de fusion comprenant le polypeptide $\text{IkB}\alpha$ et au moins une première protéine détectable, et une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert.

30. Cassette d'expression fonctionnelle dans les cellules de levure comprenant un polynucléotide qui comprend un cadre de lecture ouvert codant une protéine comprenant le polypeptide β -TrCP et une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert.

31. Cassette d'expression selon l'une des revendications 29 et 30, caractérisée en ce que la séquence régulatrice contenue dans ledit polynucléotide, comprend un promoteur fonctionnel dans les cellules de levure et qui est sensible à l'action d'un agent inducteur.

promoteur fonctionnel dans les cellules de levure et qui est sensible à l'action d'un agent inducteur.

5 32. Cassette d'expression selon la revendication 31, caractérisée en ce le promoteur inductible fonctionnel dans les cellules de levure est choisi parmi *PGK1*, *TEF1*, *PHO5*, *MET3*, *MET28*, *CUP1*, *GAL1* et *SAM4*.

10 33. Vecteur d'expression caractérisé en ce qu'il comprend une cassette d'expression selon l'une des revendications 29 à 32.

34. Vecteur d'expression selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il s'agit du vecteur pCSY226-NLS-I κ B α .

15 35. Vecteur d'expression selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il s'agit du vecteur pCSY226-NLS- β -TrCP.

36. Souche de levure recombinante comprenant, sous une forme intégrée dans son génome,

20 (i) un premier polynucléotide qui comprend un cadre de lecture ouvert codant la protéine de fusion comprenant le polypeptide le polypeptide I κ B α et au moins une première protéine détectable, et une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert; et

25 (ii) un second polynucléotide qui comprend un cadre de lecture ouvert codant une protéine comprenant le polypeptide β -TrCP et une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit cadre de lecture ouvert;

30 37. Souche de levure recombinante selon la revendication 36, caractérisée en ce qu'elle consiste en la souche de levure CYS135 déposée à la Collection Nationale de Cultures de microorganismes de l'Institut Pasteur de Paris (CNCM) sous le numéro d'accès I-3187.

32. Cassette d'expression selon la revendication 31, caractérisée en ce le promoteur inductible fonctionnel dans les cellules de levure est choisi parmi *PGK1*, *TEF1*, *PHO5*, *MET3*, *MET28*, *CUP1*, *GAL1* et *SAM4*.
- 5 33. Vecteur d'expression caractérisé en ce qu'il comprend une cassette d'expression selon l'une des revendications 29 à 32.
34. Vecteur d'expression selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il s'agit du vecteur pCSY226-NLS-I κ B α .
- 10 35. Vecteur d'expression selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il s'agit du vecteur pCSY226-NLS- β -TrCP.
- 15 36. Souche de levure recombinante comprenant, sous une forme intégrée dans son génome,
 - (i) un premier polynucléotide qui comprend un cadre de lecture ouvert codant la protéine de fusion comprenant le polypeptide I κ B α et au moins une première protéine détectable, et une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige l'expression dudit
 - 20 cadre de lecture ouvert; et
 - (ii) un second polynucléotide qui comprend un cadre de lecture ouvert codant une protéine comprenant le polypeptide β -TrCP et une séquence régulatrice fonctionnelle dans des cellules de levure qui dirige
 - 25 l'expression dudit cadre de lecture ouvert;
37. Souche de levure recombinante selon la revendication 36, caractérisée en ce qu'elle consiste en la souche de levure CYS135 déposée à la Collection Nationale de Cultures de microorganismes de l'Institut Pasteur de
- 30 Paris (CNCM) sous le numéro d'accès I-3187.
38. Trousse ou kit pour le criblage d'agents modulant l'ubiquitination de la protéine I κ B α par un complexe protéique fonctionnel ubiquitine ligase
- 35 comprenant la protéine β -TrCP, caractérisé en ce qu'il comprend :

38. Trousse ou kit pour le criblage d'agents modulant l'ubiquitination de la protéine I κ B α par un complexe protéique fonctionnel ubiquitine ligase comprenant la protéine β -TrCP, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 5 (i) un premier vecteur d'expression comprenant une cassette d'expression selon la revendication 29; et
- (ii) un second vecteur d'expression comprenant une cassette d'expression selon la revendication 30.

39. Trousse ou kit pour le criblage d'agents modulant l'ubiquitination de la
10 protéine I κ B α par un complexe protéique fonctionnel ubiquitine ligase comprenant la protéine β -TrCP, caractérisé en ce qu'il comprend des cellules de levures recombinantes comprenant, sous une forme insérée dans leur génome, respectivement :

- 15 (i) une cassette d'expression selon la revendication 29; et
- (ii) une cassette d'expression selon la revendication 30.

40. Trousse ou kit selon la revendication 39, caractérisé en ce qu'il comprend des cellules de levures recombinantes de la souche de levure CYS 135 déposée à la CNCM sous le numéro d'accès I-3187.

- (i) un premier vecteur d'expression comprenant une cassette d'expression selon la revendication 29; et
- (ii) un second vecteur d'expression comprenant une cassette d'expression selon la revendication 30.

5

39. Trousse ou kit pour le criblage d'agents modulant l'ubiquitination de la protéine $I\kappa B\alpha$ par un complexe protéique fonctionnel ubiquitine ligase comprenant la protéine β -TrCP, caractérisé en ce qu'il comprend des cellules de levures recombinantes comprenant, sous une forme insérée dans leur

10

génome, respectivement :

- (i) une cassette d'expression selon la revendication 29; et
- (ii) une cassette d'expression selon la revendication 30.

40. Trousse ou kit selon la revendication 39, caractérisé en ce qu'il comprend des cellules de levures recombinantes de la souche de levure CYS 135 déposée à la CNCM sous le numéro d'accès I-3187.

15

1/11

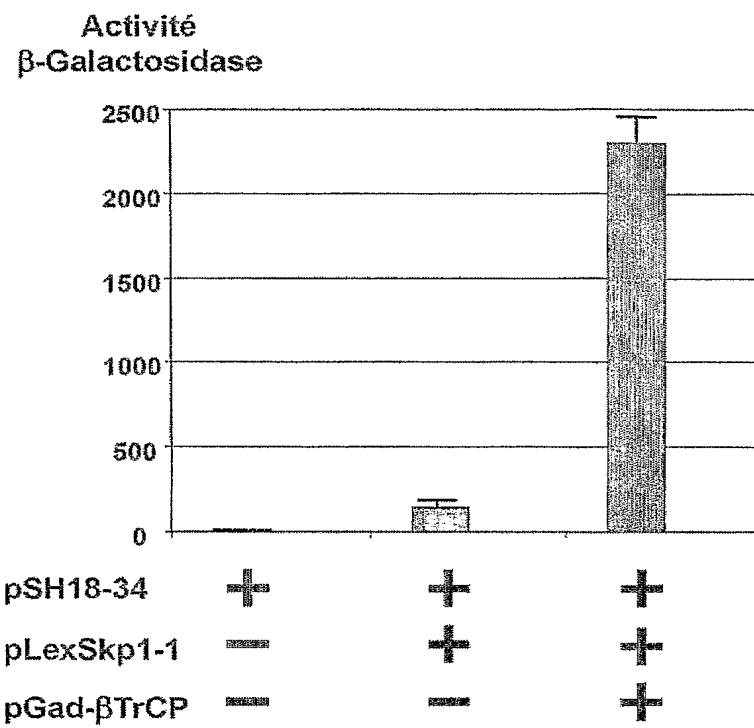


FIGURE 1

2/11

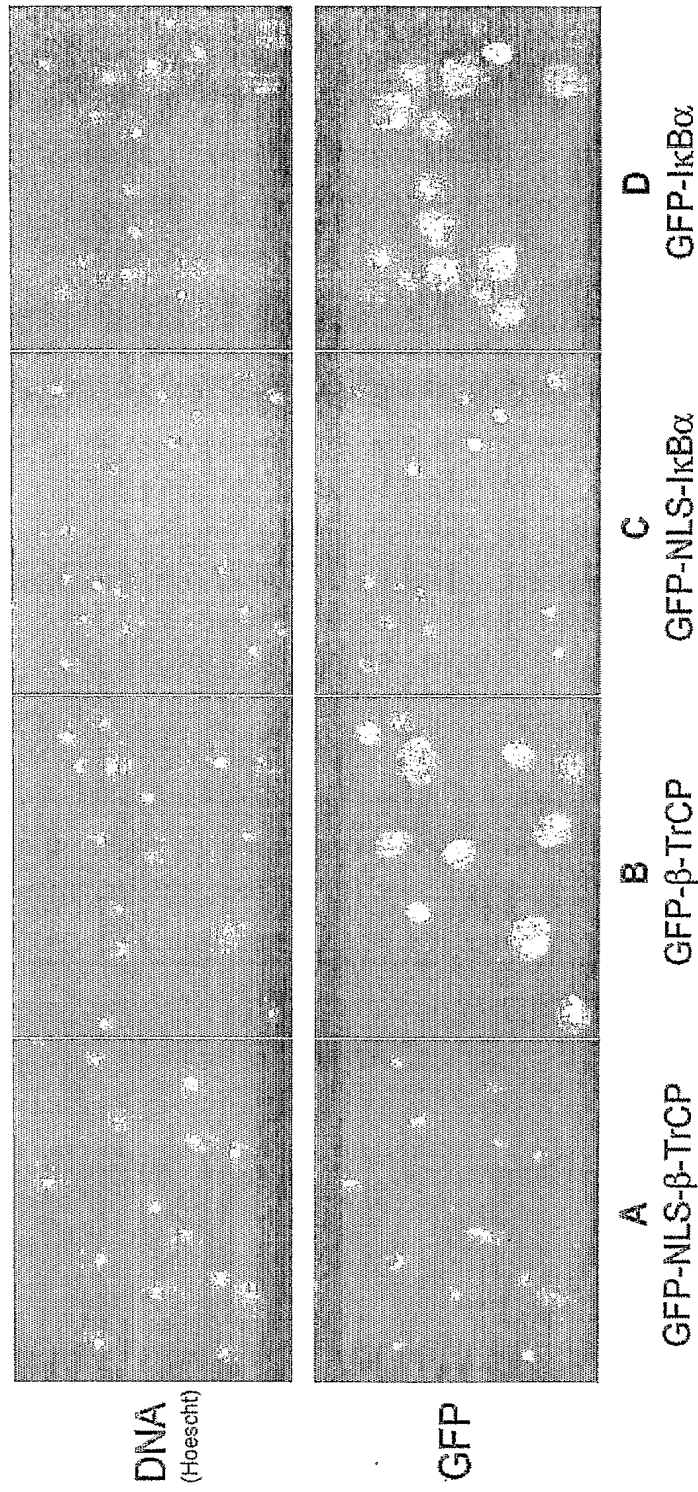


FIGURE 2

3/11

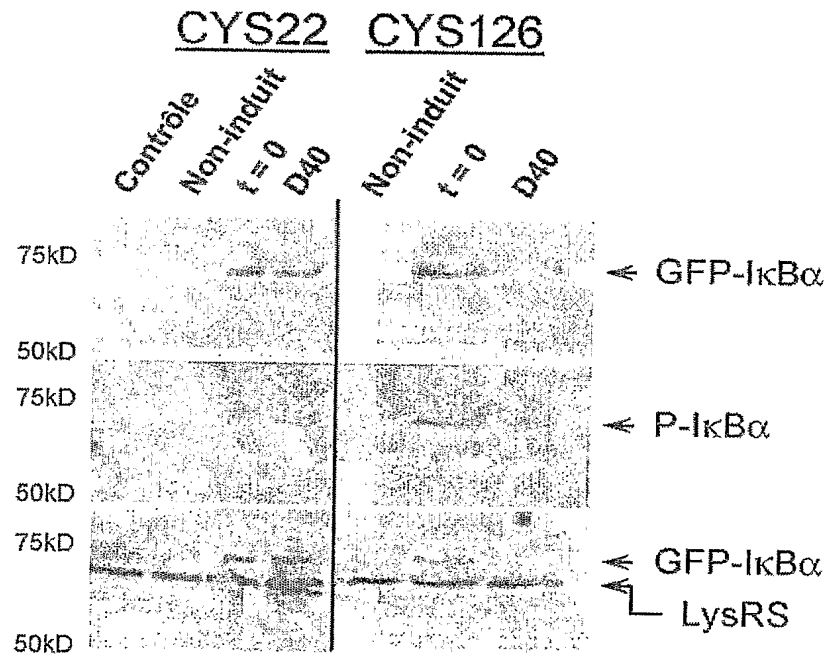


FIGURE 3

4/11

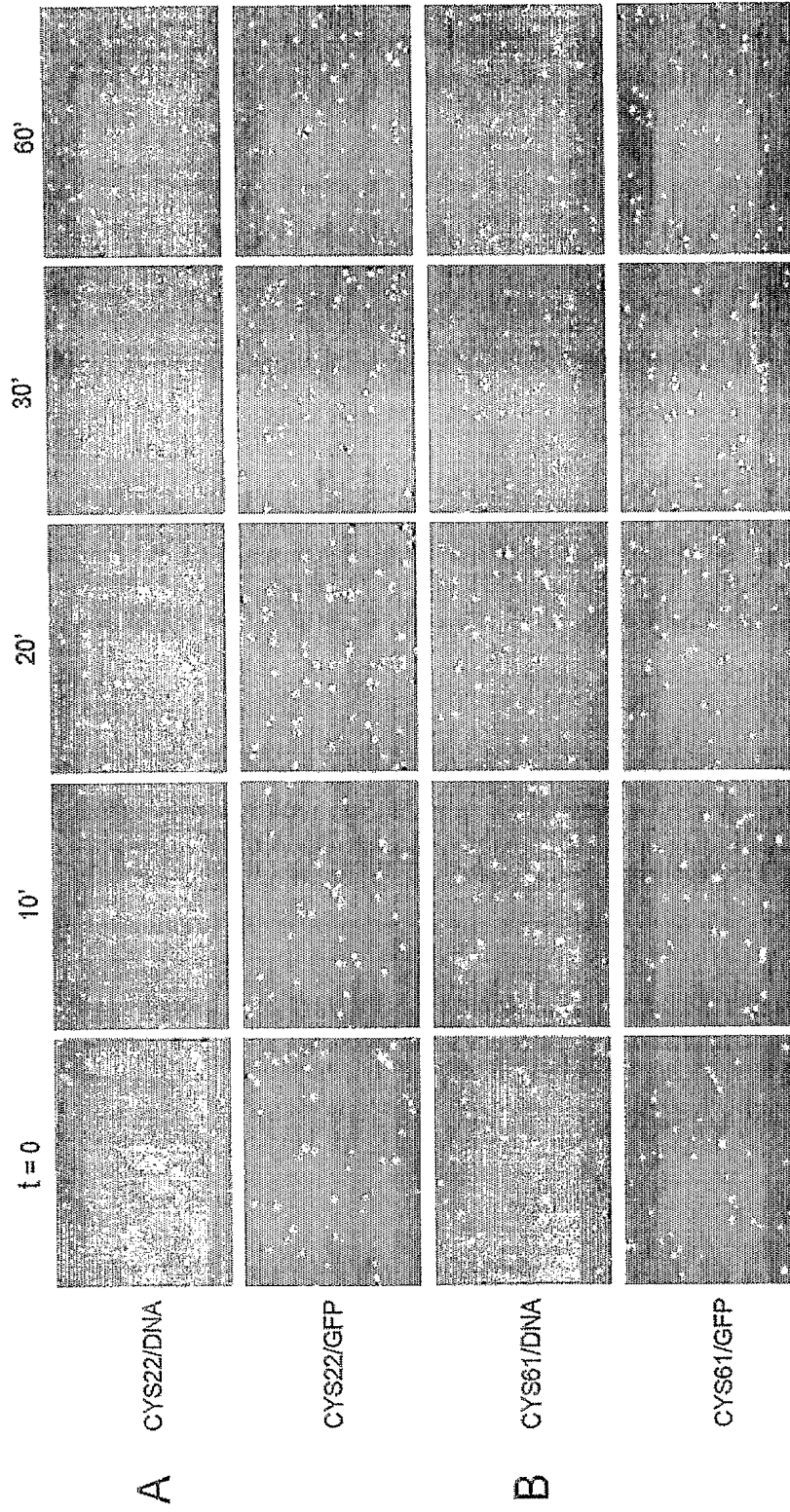


FIGURE 4

5/11

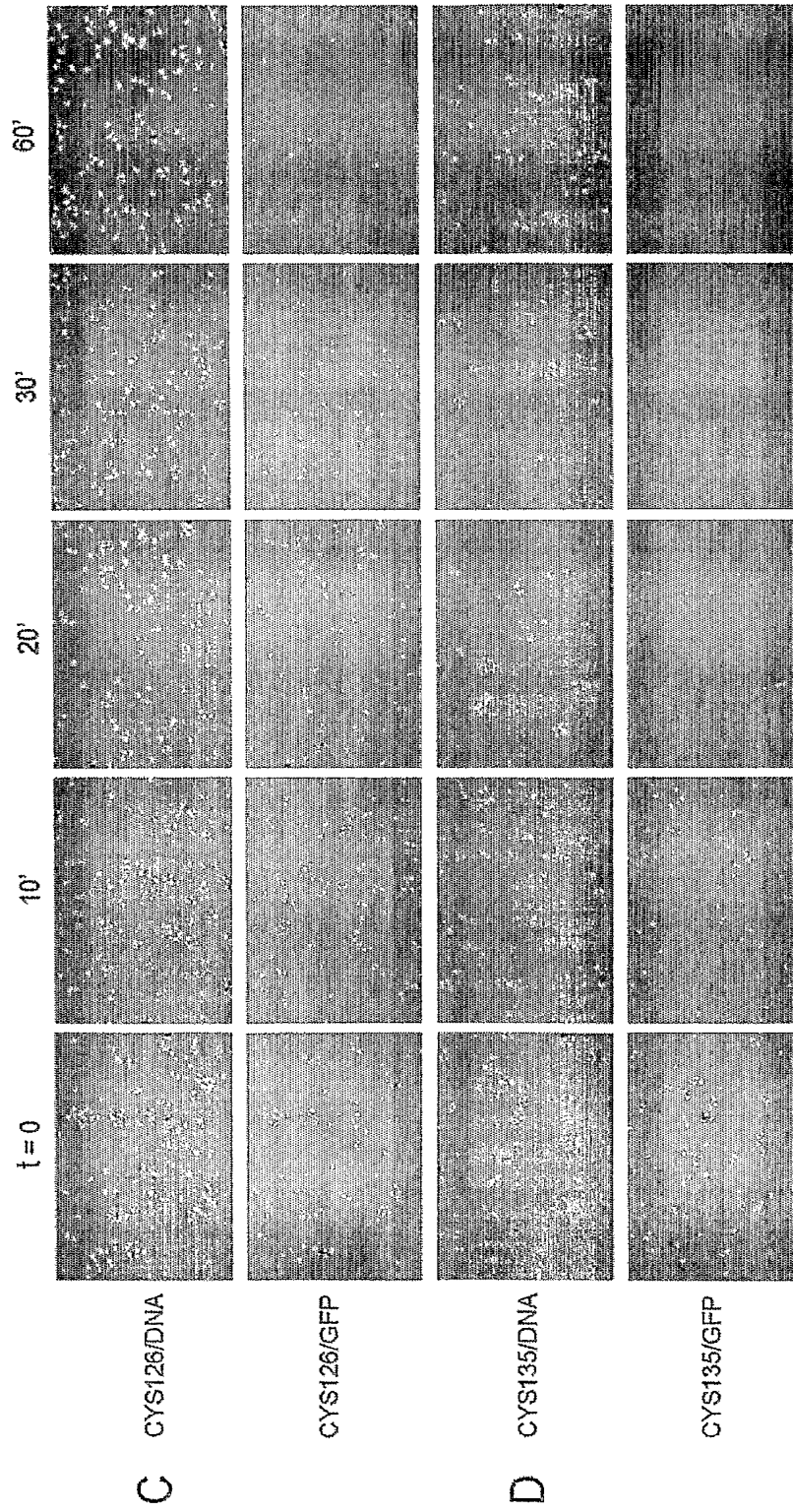


FIGURE 4

6/11

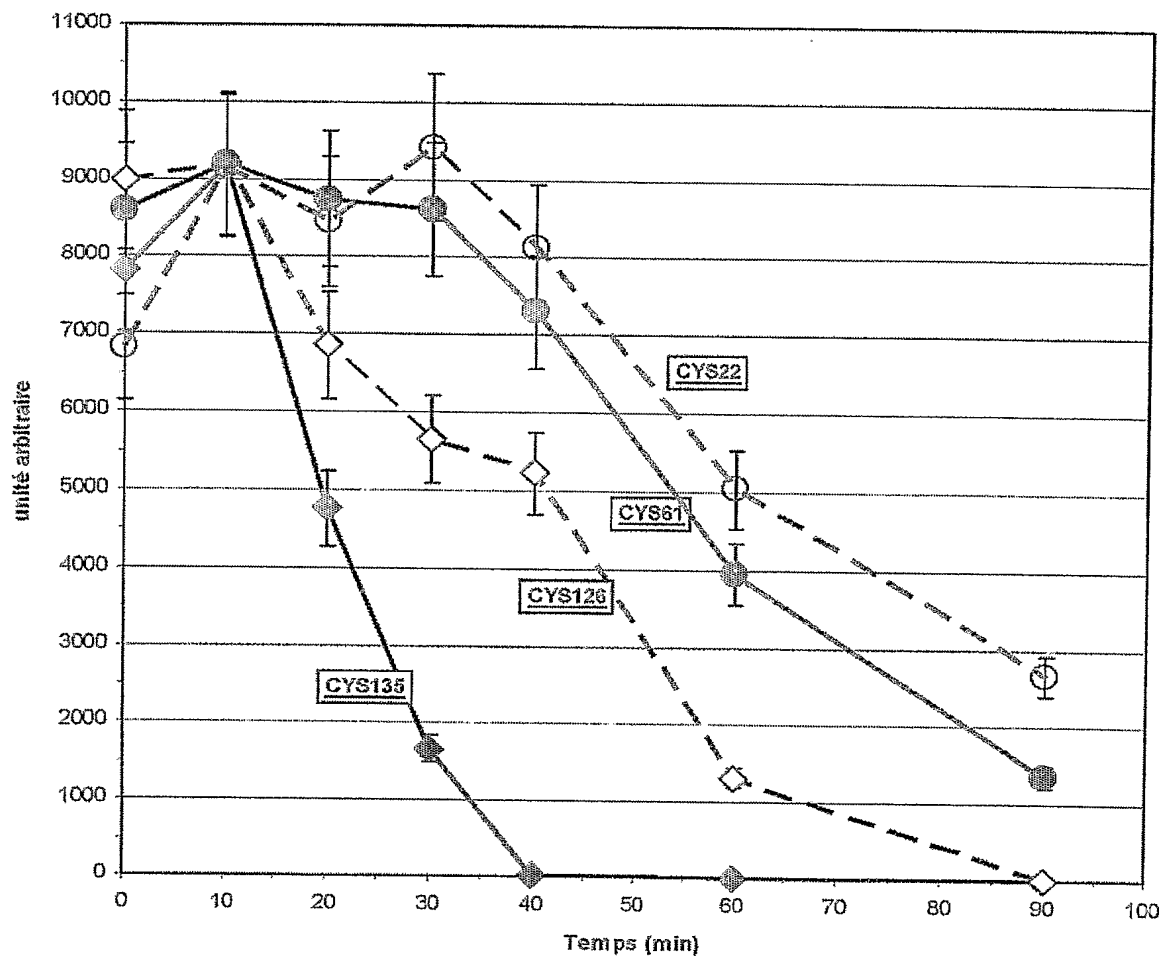
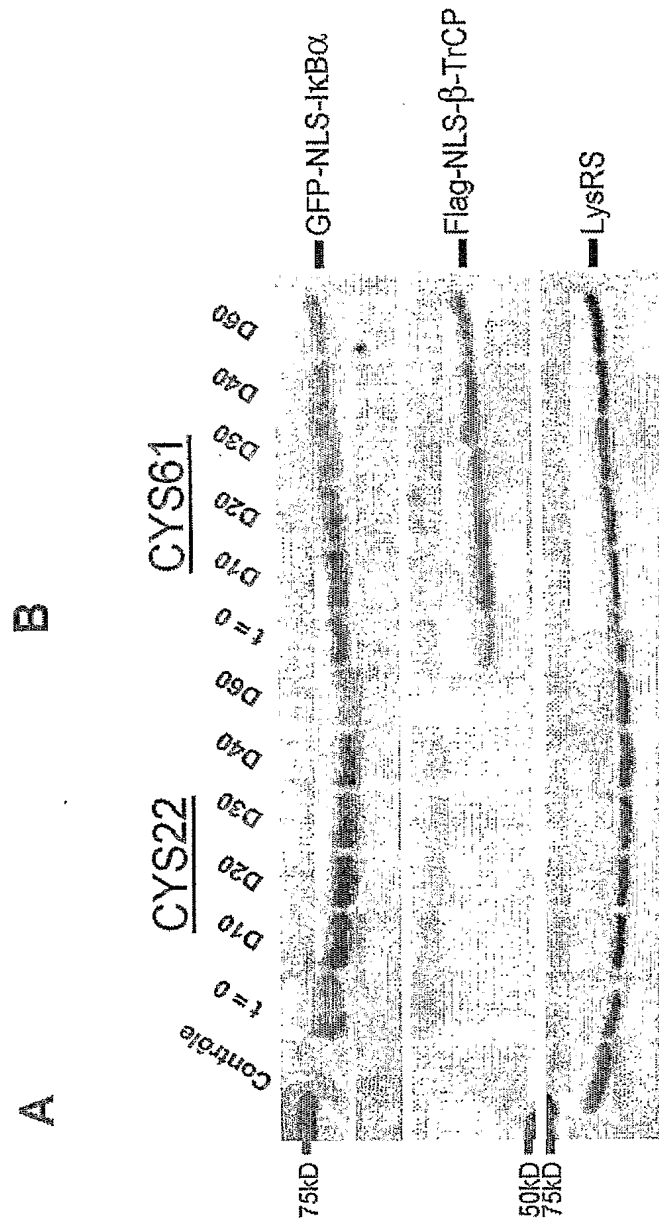


FIGURE 5

711



8/11

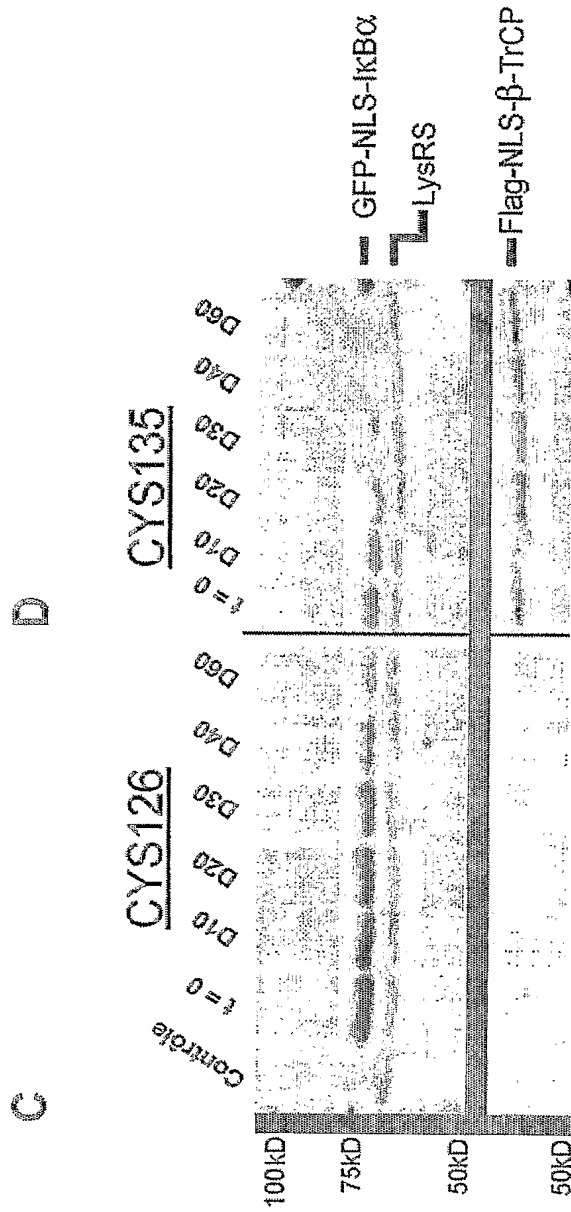


FIGURE 6

9/11

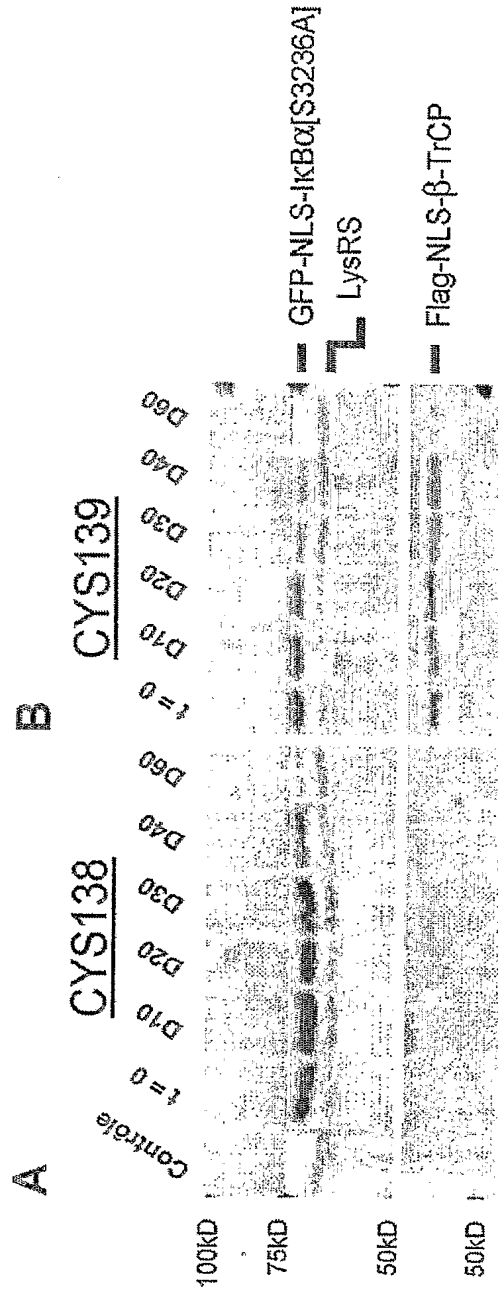


FIGURE 7

10/11

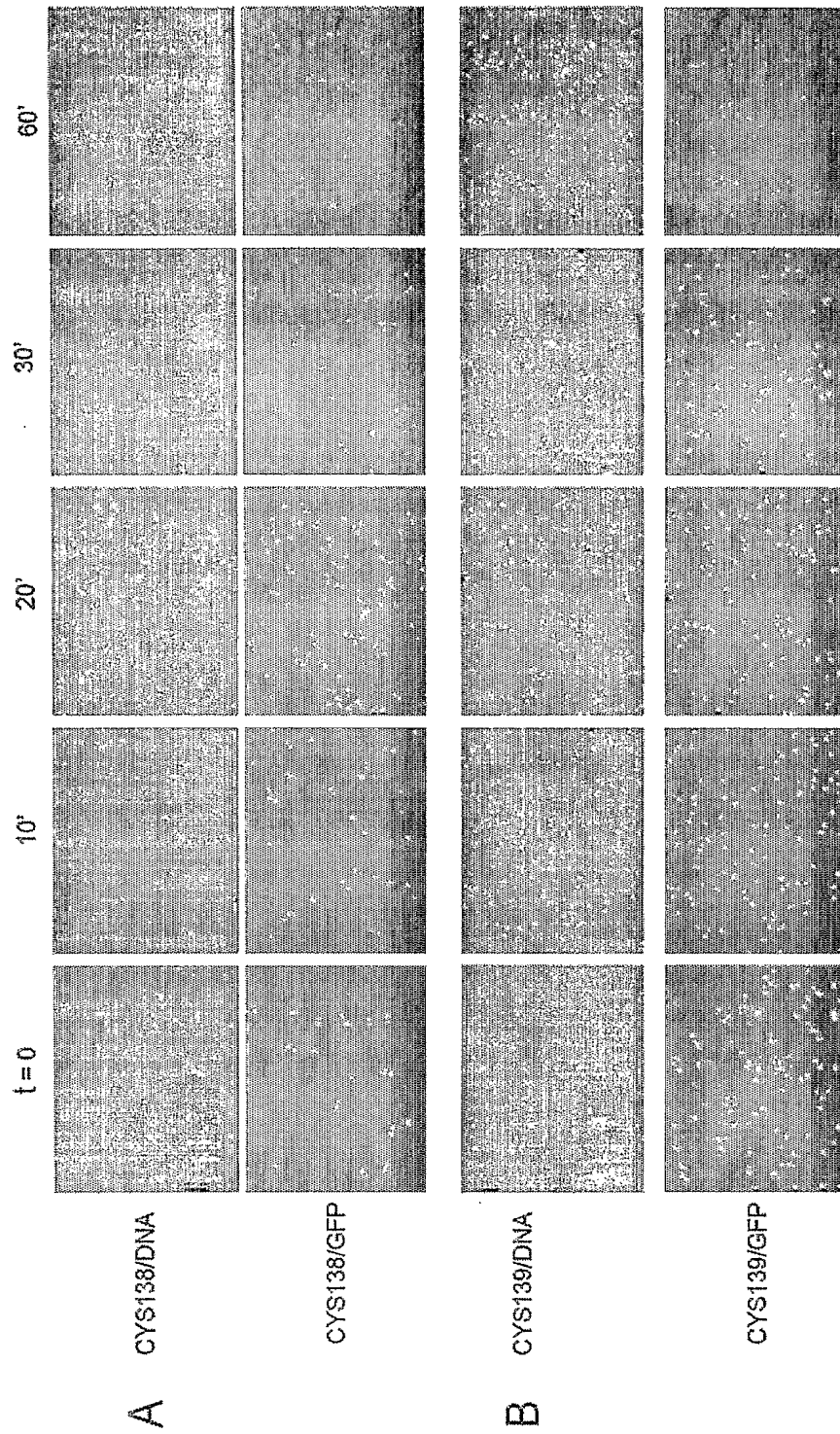


FIGURE 8

11/11

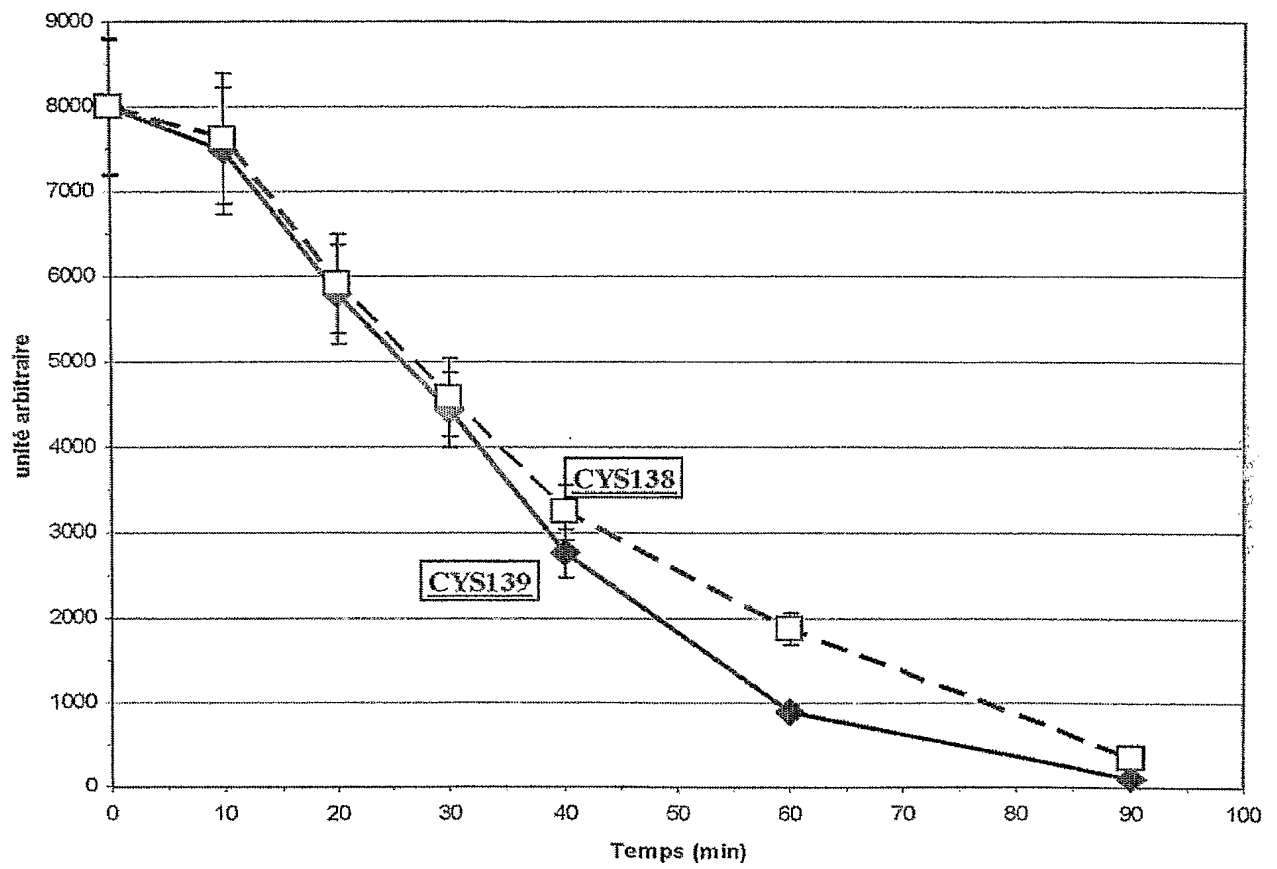


FIGURE 9

LISTE DE SEQUENCES

<110> CYTOMICS SYSTEMS

<120> Procédé de criblage d'agents modulant
l'ubiquitination de la protéine I-Kappa-B-Alpha et
moyens destinés à la mise en oeuvre dudit procédé

<130> CYTOMICS

<140>

<141>

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1719

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:GFP-NLS-IkBa

<400> 1

```

atgtctaaag gtgaagaatt attcaactggt gttgtcccaa ttttggttga attagatggt 60
gatgttaatg gtcacaaatt ttctgtctcc ggtgaagggtg aaggatgatgc tacttacggt 120
aaattgacct taaaattttat ttgtactact ggtaaattgc cagttccatg gccaacctta 180
gtcactactt tctggttatgg tgttcaatgt tttgctagat acccagatca tatgaaacaa 240
catgactttt tcaagtctgc catgccagaa ggttatgttc aagaaagaac tatttttttc 300
aaagatgacg gtaactacaa gaccagagct gaagtcaagt ttgaagggtga taccttagtt 360
aatagaatcg aattaaaagg tattgatttt aaagaagatg gtaacatttt aggtcacaaa 420
ttggaatata actataactc tcacaatggt tacatcatgg ctgacaaaca aaagaatggt 480
atcaaagtta acttcaaaat tagacacaac attgaagatg gttctgttca attagctgac 540
cattatcaac aaaatactcc aattggtgat ggtccagtct tgttaccaga caaccattac 600
ttatccactc aatctgcctt atccaaagat ccaaacgaaa agagagacca catggtcttg 660
ttagaatttg ttactgctgc tgggtattacc catggtatgg atgaattgta caaactgcag 720
agcccacctc caaaaaagaa gagaaaggtc gaattgggag gatccatggt ccaggcggcc 780
gagcgcctcc aggagtgggc catggagggc cccgcgcacg ggctgaagaa ggagcggcta 840
ctggacgacc gccacgacag cggcctggac tccatgaaag acgaggagta cgagcagatg 900
gtcaaggagc tgcaggagat ccgcctcgag ccgcaggagg tgccgcgcgg ctccggagccc 960
tggaagcagc agctcaccga ggacggggac tgcgttcctgc acttggccat catccatgaa 1020
gaaaaggcac tgaccatgga agtgatccgc cagggtgaagg gagacctggc tttcctcaac 1080
ttccagaaca acctgcagca gactccactc cacttggctg tgatcaccaa ccagccagaa 1140
attgctgagg cacttctggg agctggctgt gatcctgagc tccgagactt tccaggaaat 1200
acccccctac accttgccctg tgagcagggc tgccctggcca gcgtgggagt cctgactcag 1260
tcctgcacca cccgcacct ccactccatc ctgaaggcta ccaactacaa tggccacacg 1320
tgtctacact tagcctctat ccatggctac ctgggcatcg tggagctttt ggtgtccttg 1380
ggtgctgatg tcaatgctca ggagccctgt aatggccgga ctgcccttca cctgcagtg 1440
gacctgcaaa atcctgacct ggtgtcactc ctggtgaagt gtggggctga tgtcaacaga 1500
gttacctacc agggctattc tccctaccag ctacactggg gccgccaag caccggata 1560
cagcagcagc tgggcccagct gacactagaa aaccttcaga tgctgccaga gagtgaggat 1620
gaggagagct atgacacaga gtcagagttc acggagttca cagaggacga gctgccctat 1680
gatgactgtg tgtttggagg ccagcgtctg acgttatga 1719

```

<400>	2															
Met	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	
1				5					10					15		
Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	
			20					25					30			
Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	
		35					40					45				
Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Phe	
	50					55					60					
Gly	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ala	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys	Gln	
65					70					75					80	
His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	
				85					90					95		
Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	
			100					105					110			
Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	
		115					120					125				
Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	
	130					135					140					
Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	
145					150					155					160	
Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	
				165					170					175		
Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	
			180					185					190			
Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	
	195						200					205				
Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe	Val	
	210					215					220					
Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	His	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys	Leu	Gln	
225					230					235					240	
Ser	Pro	Pro	Pro	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Val	Glu	Leu	Gly	Gly	Ser	Met	
				245					250					255		

Phe Gln Ala Ala Glu Arg Pro Gln Glu Trp Ala Met Glu Gly Pro Arg
 260 265 270
 Asp Gly Leu Lys Lys Glu Arg Leu Leu Asp Asp Arg His Asp Ser Gly
 275 280 285
 Leu Asp Ser Met Lys Asp Glu Glu Tyr Glu Gln Met Val Lys Glu Leu
 290 295 300
 Gln Glu Ile Arg Leu Glu Pro Gln Glu Val Pro Arg Gly Ser Glu Pro
 305 310 315 320
 Trp Lys Gln Gln Leu Thr Glu Asp Gly Asp Ser Phe Leu His Leu Ala
 325 330 335
 Ile Ile His Glu Glu Lys Ala Leu Thr Met Glu Val Ile Arg Gln Val
 340 345 350
 Lys Gly Asp Leu Ala Phe Leu Asn Phe Gln Asn Asn Leu Gln Gln Thr
 355 360 365
 Pro Leu His Leu Ala Val Ile Thr Asn Gln Pro Glu Ile Ala Glu Ala
 370 375 380
 Leu Leu Gly Ala Gly Cys Asp Pro Glu Leu Arg Asp Phe Arg Gly Asn
 385 390 395 400
 Thr Pro Leu His Leu Ala Cys Glu Gln Gly Cys Leu Ala Ser Val Gly
 405 410 415
 Val Leu Thr Gln Ser Cys Thr Thr Pro His Leu His Ser Ile Leu Lys
 420 425 430
 Ala Thr Asn Tyr Asn Gly His Thr Cys Leu His Leu Ala Ser Ile His
 435 440 445
 Gly Tyr Leu Gly Ile Val Glu Leu Leu Val Ser Leu Gly Ala Asp Val
 450 455 460
 Asn Ala Gln Glu Pro Cys Asn Gly Arg Thr Ala Leu His Leu Ala Val
 465 470 475 480
 Asp Leu Gln Asn Pro Asp Leu Val Ser Leu Leu Leu Lys Cys Gly Ala
 485 490 495
 Asp Val Asn Arg Val Thr Tyr Gln Gly Tyr Ser Pro Tyr Gln Leu Thr
 500 505 510
 Trp Gly Arg Pro Ser Thr Arg Ile Gln Gln Gln Leu Gly Gln Leu Thr
 515 520 525
 Leu Glu Asn Leu Gln Met Leu Pro Glu Ser Glu Asp Glu Glu Ser Tyr
 530 535 540
 Asp Thr Glu Ser Glu Phe Thr Glu Phe Thr Glu Asp Glu Leu Pro Tyr
 545 550 555 560
 Asp Asp Cys Val Phe Gly Gly Gln Arg Leu Thr Leu

565

570

<210> 3
 <211> 2583
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence
 artificielle:GFP-NLS-bTRCP

<400> 3
 atgtctaaag gtgaagaatt attcactggt gttgtcccaa ttttggttga attagatggt 60
 gatgttaatg gtcacaaatt ttctgtctcc ggtgaagggtg aaggatgatgc tacttacggt 120
 aaattgacct taaaatttat ttgtactact ggtaaattgc cagttccatg gccaacctta 180
 gtcactactt tcggttatgg tgttcaatgt tttgctagat acccagatca tatgaaacaa 240
 catgactttt tcaagtctgc catgccagaa ggttatgttc aagaaagaac tatttttttc 300
 aaagatgacg gtaactacaa gaccagagct gaagtcaagt ttgaagggtga tacottagtt 360
 aatagaatcg aattaaagg tattgatttt aaagaagatg gtaacatttt aggtcacaaa 420
 ttggaataca actataactc tcacaatggt tacatcatgg ctgacaaaca aaagaatggt 480
 atcaaagtta acttcaaaat tagacacaaac attgaagatg gttctgttca attagctgac 540
 cattatcaac aaaatactcc aattggtgat ggtccagtct tgttaccaga caaccattac 600
 ttatccactc aatctgcctt atccaaagat ccaaacgaaa agagagacca catggtcttg 660
 ttagaatttg ttaactgctgc tgggtattacc catggtatgg atgaattgta caaactgcag 720
 agcccacctc caaaaaagaa gagaaagggtc gaattggggtg gatccatgga cccggccgag 780
 gcggtgctgc aagagaaggc actcaagttt atgtgtctta tgcccagggtc tctgtgggtg 840
 ggctgctcca gctggcgga cagcatgcct togtgtcgat gcctgtataa cccagggtac 900
 ggcgactca cagctttcca gaattcctca gagagagaag actgtaataa tggcgaaccc 960
 cctaggaaga taataccaga gaagaattca cttagacaga catacaacag ctgtgccaga 1020
 ctctgcttaa accaagaaac agtatgttta gcaagcactg ctatgaagac tgagaattgt 1080
 gtggccaaaa caaaacttgc caatggcact tccagtatga ttgtgcccaa gcaacggaaa 1140
 ctctcagcaa gctatgaaaa ggaaaaggaa ctgtgtgtca aatactttga gcagtgggtca 1200
 gagtcagatc aagtggaaat tgtggaacat cttatatccc aaatgtgtca ttaccaacat 1260
 gggcaccataa actcgtatct taaacctatg ttgcagagag atttcataac tgctctgcca 1320
 gctcggggat tggatcatat tgotgagaac attctgtcat acctggatgc caaatcacta 1380
 tgtgtgtgtg aacttgtgtg caaggaatgg taccgagtga cctctgatgg catgctgtgg 1440
 aagaagctta tcgagagaat ggtcaggaca gattctotgt ggagaggcct ggcagaacga 1500
 agaggatggg gacagtattt attcaaaaac aaacctcctg acgggaatgc tcctcccaac 1560
 tctttttata gagcacttta tcctaaaatt atacaagaca ttgagacaat agaattcta 1620
 tggagatgtg gaagacatag ttacagaga attcactgcc gaagtgaac aagcaaagga 1680
 gtttactgtt tacagtatga tgatcagaaa atagtaagcg gccttcgaga caacacaatc 1740
 aagatctggg ataaaaacac attggaatgc aagogaattc tcacaggcca tacaggttca 1800
 gtcctctgtc tccagtatga tgagagagtg atcataacag gatcatcgga ttccacgggtc 1860
 agagtgtggg atgtaaatac aggtgaaatg ctaaacacgt tgattcacca ttgtgaagca 1920
 gttctgcact tgcgtttcaa taatggcatg atggtgacct gctccaaaga tcgttccatt 1980
 gctgtatggg atatggcctc cccaactgac attaccctcc ggagggtgct ggtcggacac 2040
 cgagctgtgt tcaatgttgt agactttgat gacaagtaca ttgtttctgc atctggggat 2100
 agaactataa aggtatggaa cacaagtact tgtgaatttg taaggacctt aaatggacac 2160
 aaacgaggca ttgcctgttt gcagtacagg gacaggctgg tagtgagtgg ctcatctgac 2220
 aacactatca gattatggga catagaatgt ggtgcatgtt tacgagtgtt agaaggccat 2280
 gaggaattgg tgcgttgtat tcgatttgat aacaagagga tagtcagtgg ggcctatgat 2340
 ggaaaaatta aagtgtggga tcttgtggct gctttggacc cccgtgctcc tgcagggaca 2400
 ctctgtctac ggacccttgt ggagcattcc ggaagagttt ttcgactaca gtttgatgaa 2460
 ttocagattg tcagtgttc acatgatgac acaatcctca tctgggactt cctaaatgat 2520
 ccagctgccc aagctgaacc ccccggttc ccttctcgaa catacaccta catctccaga 2580
 tga 2583

<400> 4															
Met 1	Ser	Lys	Gly	Glu 5	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly 10	Val	Val	Pro	Ile	Leu 15	Val
Glu	Leu	Asp	Gly 20	Asp	Val	Asn	Gly	His 25	Lys	Phe	Ser	Val	Ser 30	Gly	Glu
Gly	Glu	Gly 35	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly 40	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys 45	Phe	Ile	Cys
Thr 50	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val 55	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu 60	Val	Thr	Thr	Phe
Gly 65	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys 70	Phe	Ala	Arg	Tyr	Pro 75	Asp	His	Met	Lys	Gln 80
His	Asp	Phe	Phe	Lys 85	Ser	Ala	Met	Pro	Glu 90	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu 95	Arg
Thr	Ile	Phe	Phe 100	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn 105	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala 110	Glu	Val
Lys	Phe	Glu 115	Gly	Asp	Thr	Leu	Val 120	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu 125	Lys	Gly	Ile
Asp 130	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn 135	Ile	Leu	Gly	His	Lys 140	Leu	Glu	Tyr	Asn
Tyr 145	Asn	Ser	His	Asn 150	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp 155	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly 160
Ile	Lys	Val	Asn 165	Phe	Lys	Ile	Arg	His 170	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser 175	Val
Gln	Leu	Ala	Asp 180	His	Tyr	Gln	Gln	Asn 185	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp 190	Gly	Pro
Val	Leu	Leu 195	Pro	Asp	Asn	His 200	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser 205	Ala	Leu	Ser
Lys	Asp 210	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg 215	Asp	His	Met	Val	Leu 220	Leu	Glu	Phe	Val
Thr 225	Ala	Ala	Gly	Ile 230	Thr	His	Gly	Met	Asp	Glu 235	Leu	Tyr	Lys	Leu	Gln 240
Ser	Pro	Pro	Pro	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Val	Glu	Leu	Gly	Gly	Ser	Met

245								250				255				
Asp	Pro	Ala	Glu	Ala	Val	Leu	Gln	Glu	Lys	Ala	Leu	Lys	Phe	Met	Cys	
			260					265					270			
Ser	Met	Pro	Arg	Ser	Leu	Trp	Leu	Gly	Cys	Ser	Ser	Leu	Ala	Asp	Ser	
		275					280					285				
Met	Pro	Ser	Leu	Arg	Cys	Leu	Tyr	Asn	Pro	Gly	Thr	Gly	Ala	Leu	Thr	
	290					295					300					
Ala	Phe	Gln	Asn	Ser	Ser	Glu	Arg	Glu	Asp	Cys	Asn	Asn	Gly	Glu	Pro	
305					310					315					320	
Pro	Arg	Lys	Ile	Ile	Pro	Glu	Lys	Asn	Ser	Leu	Arg	Gln	Thr	Tyr	Asn	
				325					330					335		
Ser	Cys	Ala	Arg	Leu	Cys	Leu	Asn	Gln	Glu	Thr	Val	Cys	Leu	Ala	Ser	
			340					345					350			
Thr	Ala	Met	Lys	Thr	Glu	Asn	Cys	Val	Ala	Lys	Thr	Lys	Leu	Ala	Asn	
		355					360					365				
Gly	Thr	Ser	Ser	Met	Ile	Val	Pro	Lys	Gln	Arg	Lys	Leu	Ser	Ala	Ser	
	370					375					380					
Tyr	Glu	Lys	Glu	Lys	Glu	Leu	Cys	Val	Lys	Tyr	Phe	Glu	Gln	Trp	Ser	
385					390					395					400	
Glu	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Phe	Val	Glu	His	Leu	Ile	Ser	Gln	Met	Cys	
				405					410					415		
His	Tyr	Gln	His	Gly	His	Ile	Asn	Ser	Tyr	Leu	Lys	Pro	Met	Leu	Gln	
			420					425					430			
Arg	Asp	Phe	Ile	Thr	Ala	Leu	Pro	Ala	Arg	Gly	Leu	Asp	His	Ile	Ala	
		435					440					445				
Glu	Asn	Ile	Leu	Ser	Tyr	Leu	Asp	Ala	Lys	Ser	Leu	Cys	Ala	Ala	Glu	
	450					455					460					
Leu	Val	Cys	Lys	Glu	Trp	Tyr	Arg	Val	Thr	Ser	Asp	Gly	Met	Leu	Trp	
465					470					475					480	
Lys	Lys	Leu	Ile	Glu	Arg	Met	Val	Arg	Thr	Asp	Ser	Leu	Trp	Arg	Gly	
				485					490					495		
Leu	Ala	Glu	Arg	Arg	Gly	Trp	Gly	Gln	Tyr	Leu	Phe	Lys	Asn	Lys	Pro	
			500					505					510			
Pro	Asp	Gly	Asn	Ala	Pro	Pro	Asn	Ser	Phe	Tyr	Arg	Ala	Leu	Tyr	Pro	
		515					520					525				
Lys	Ile	Ile	Gln	Asp	Ile	Glu	Thr	Ile	Glu	Ser	Asn	Trp	Arg	Cys	Gly	
	530					535					540					
Arg	His	Ser	Leu	Gln	Arg	Ile	His	Cys	Arg	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Gly	
545					550					555					560	

Val Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Gln Lys Ile Val Ser Gly Leu Arg
 565 570 575
 Asp Asn Thr Ile Lys Ile Trp Asp Lys Asn Thr Leu Glu Cys Lys Arg
 580 585 590
 Ile Leu Thr Gly His Thr Gly Ser Val Leu Cys Leu Gln Tyr Asp Glu
 595 600 605
 Arg Val Ile Ile Thr Gly Ser Ser Asp Ser Thr Val Arg Val Trp Asp
 610 615 620
 Val Asn Thr Gly Glu Met Leu Asn Thr Leu Ile His His Cys Glu Ala
 625 630 635 640
 Val Leu His Leu Arg Phe Asn Asn Gly Met Met Val Thr Cys Ser Lys
 645 650 655
 Asp Arg Ser Ile Ala Val Trp Asp Met Ala Ser Pro Thr Asp Ile Thr
 660 665 670
 Leu Arg Arg Val Leu Val Gly His Arg Ala Ala Val Asn Val Val Asp
 675 680 685
 Phe Asp Asp Lys Tyr Ile Val Ser Ala Ser Gly Asp Arg Thr Ile Lys
 690 695 700
 Val Trp Asn Thr Ser Thr Cys Glu Phe Val Arg Thr Leu Asn Gly His
 705 710 715 720
 Lys Arg Gly Ile Ala Cys Leu Gln Tyr Arg Asp Arg Leu Val Val Ser
 725 730 735
 Gly Ser Ser Asp Asn Thr Ile Arg Leu Trp Asp Ile Glu Cys Gly Ala
 740 745 750
 Cys Leu Arg Val Leu Glu Gly His Glu Glu Leu Val Arg Cys Ile Arg
 755 760 765
 Phe Asp Asn Lys Arg Ile Val Ser Gly Ala Tyr Asp Gly Lys Ile Lys
 770 775 780
 Val Trp Asp Leu Val Ala Ala Leu Asp Pro Arg Ala Pro Ala Gly Thr
 785 790 795 800
 Leu Cys Leu Arg Thr Leu Val Glu His Ser Gly Arg Val Phe Arg Leu
 805 810 815
 Gln Phe Asp Glu Phe Gln Ile Val Ser Ser Ser His Asp Asp Thr Ile
 820 825 830
 Leu Ile Trp Asp Phe Leu Asn Asp Pro Ala Ala Gln Ala Glu Pro Pro
 835 840 845
 Arg Ser Pro Ser Arg Thr Tyr Thr Tyr Ile Ser Arg
 850 855 860

<210> 5
<211> 21
<212> ADN
<213> Simian virus 40

<400> 5
ccaaaaaaga agagaaaggt c 21

<210> 6
<211> 35
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 6
gctgggtacc ttaataatca tattacatgg catta 35

<210> 7
<211> 34
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 7
ggcggaattc tatagttttt tctccttgac gtta 34

<210> 8
<211> 35
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 8
ggtcggaatt catgtctaaa ggtgaagaat tatta 35

<210> 9
<211> 46
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 9
ggcgggatcc gcccgggctc tgcagtttgt acaattcatc catacc 46

<210> 10
<211> 44
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 10
ggcggcgcc gccaccgcg tgggcgaatt tcttatgatt tatg 44

<210> 11
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 11
ggcggagctc tggaagaacg attacaacag 30

<210> 12
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 12
acctccaaaa aagaagagaa aggtcgaatt 30

<210> 13
<211> 31
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 13
ggcgggtacc gtgagtaagg aaagagtgag g 31

<210> 14
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 14

ggcggaattc tgttttatat ttgttgtaaa aag

33

<210> 15

<211> 33

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 15

ggcggaattc atggactaca aagaccatga cgg

33

<210> 16

<211> 46

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 16

ggcgggatcc gcccgggctc tgcagcttgt catcgatc cttgta

46

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:HA

<400> 17

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1

5

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:FLAG

<400> 18

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

<210> 19

<211> 23

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:FLAG

<400> 19

Met Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp
 1 5 10 15

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 20

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:NLS

<400> 20

Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys
 1 5 10 15

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:NLS

<400> 21

Met Asn Lys Ile Pro Ile Lys Asp Leu Leu Asn Pro Gln
 1 5 10

<210> 22

<211> 19

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:NLS

<400> 22

Val Arg Ile Leu Glu Ser Trp Phe Ala Lys Asn Ile Glu Asn Pro Lys
 1 5 10 15

Leu Asp Thr

<210> 23
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:NLS

<400> 23
 Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu
 1 5 10 15
 Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu
 20 25 30
 Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro
 35 40 45
 Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu
 50 55 60
 Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg
 65 70

<210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle

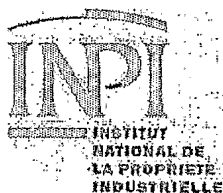
<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:NLS

<400> 24
 Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 1 5

<210> 25
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 25
 aattcgacct ttctcttctt ttttgaggt



BREVET D'INVENTION **CERTIFICAT D'UTILITE**



Désignation de l'inventeur

Vos références pour ce dossier	R045FR
N°D'ENREGISTREMENT NATIONAL	
TITRE DE L'INVENTION	0450528
	PROCEDE DE CRIBLAGE D'AGENT MODULANT L'UBIQUITINATION DE LA PROTEINE IkbAlpha ET MOYENS DESTINES A LA MISE EN OEUVRE DUDIT PROCEDE
LE(S) DEMANDEUR(S) OU LE(S) MANDATAIRE(S):	
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S):	
Inventeur 1	
Nom	BOUGERET
Prénoms	Cécile
Rue	2 impasse du moulin de JUBICIAUX
Code postal et ville	91190 GIF SUR YVETTE
Société d'appartenance	
Inventeur 2	
Nom	ZARZOV
Prénoms	Patrick
Rue	24, rue Joseph BERTRAND
Code postal et ville	78220 VIROFLAY
Société d'appartenance	
Inventeur 3	
Nom	BRIAND
Prénoms	Jean-François
Rue	13, rue du LOING
Code postal et ville	75014 PARIS
Société d'appartenance	
Inventeur 4	
Nom	THOMAS
Prénoms	Dominique
Rue	34 Allée des Gravières de la SALMOUILLE
Code postal et ville	91190 GIF SUR YVETTE
Société d'appartenance	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

CATHERINE Alain
C.P.I. bm (92-1045 i)
Cabinet HARLE ET PHELIP

Paris, le 17 mars 2005



PCT/FR2005/050165

